

**Die Analyse der Sauerstofftoleranz und biotechnologische  
Anwendung der NAD<sup>+</sup>-reduzierenden Hydrogenase  
aus *Ralstonia eutropha* H16**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl. Biol. (t.o.) Lars Lauterbach

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Stefan Hecht, PhD

Gutachter/innen:    1. Prof. Dr. B. Friedrich  
                              2. Prof. Dr. P. Hildebrandt  
                              3. Prof. Dr. H. Dobbek

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2013

Diese Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Bärbel Friedrich und Dr. Oliver Lenz am Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin angefertigt.

Die Untersuchungen wurden aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Exzellenzcluster „Unifying Concepts in Catalysis“) und dem European Research Council gefördert. Die Forschungsaufenthalte an der Universität Oxford wurden aus Mitteln der Royal Society finanziert.

**Teile dieser Arbeit wurden publiziert:**

- **Horch M\*, Lauterbach L\*, Saggu M\*, Hildebrandt P, Lenz O und Zebger I.** 2010 Probing the active site of an O<sub>2</sub>-tolerant NAD<sup>+</sup>-reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 by *in situ* EPR und FTIR Spectroscopy Angew. Chem. Int. Ed. 49, 8026-8029

- **Horch M\*, Lauterbach L\*, Saggu M\*, Hildebrandt P, Lenz O und Zebger I.** 2010 Untersuchung des katalytischen Zentrums der O<sub>2</sub>-toleranten NAD<sup>+</sup>-reduzierenden [NiFe]-Hydrogenase von *Ralstonia eutropha* H16 mit In-situ-EPR- und -FTIR-Spektroskopie Angew. Chemie 43, 8200–8203

- **Lauterbach L\*, Liu J\*, Horch M\*, Hummel P, Schwarze A, Haumann M, Vincent KA, Lenz L, Zebger I.** 2011 The hydrogenase subcomplex of the NAD<sup>+</sup>-reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha*- insights into catalysis und redox interconversions Eur. J. Inorg. Chem. 1067-1079

- **Ratzka J, Lauterbach L, Lenz O, Ansorge-Schumacher M** 2011 Systematic evaluation of the dihydrogen oxidising und NAD<sup>+</sup>-reducing soluble [NiFe]- hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 as a cofactor regeneration catalyst Biocat.& Biotrans. doi:10.3109/10242422.2011.615393

- **Lauterbach L, Idris Z, Vincent KA, Lenz O** 2011 Catalytic properties of the isolated diaphorase fragment of the NAD<sup>+</sup>-reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* PLoS ONE 6: e25939

- **Horch M, Lauterbach L, Lenz O, Hildebrandt P, Zebger I** 2012 NAD(H)-coupled hydrogen cycling – structure–function relationships of bidirectional [NiFe] hydrogenases FEBS Lett. 586:545-556
  
- **Reeve H, Lauterbach L, Ash P, Lenz O, Vincent K** 2012 A modular system for regeneration of NAD cofactors using graphite particles modified with hydrogenase und diaphorase moieties Chem. Commun. 48:1589–1591
  
- **Ratzka J, Lauterbach L, Lenz O, Ansorge-Schumacher M** 2012 Stabilisation of the NAD<sup>+</sup>-reducing soluble [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 through modification with methoxy-poly(ethylene) glycol J. Mol. Catal. B Enzym 74:219– 223
  
- **Lauterbach L, Lenz O, Vincent K** 2013 H<sub>2</sub>-driven cofactor regeneration with NAD(P)<sup>+</sup>-reducing hydrogenases FEBS Journal 280:3058-3068.
  
- **Herr N, Ratzka J, Lauterbach L, Lenz L, Ansorge-Schumacher MB** 2013 Stability enhancement of an O<sub>2</sub>-tolerant NAD<sup>+</sup>-reducing [NiFe]-hydrogenase by a combination of immobilisation und chemical modification J. Mol. Catal. B Enzym 97:169– 174<sup>^</sup>
  
- **Lauterbach L, Lenz O** 2013 Catalytic water production by oxygen-tolerant [NiFe]-hydrogenase during H<sub>2</sub> cycling in the presence of O<sub>2</sub>, J. Am. Chem. Soc. 135, 17897-17905.

**Patente:**

**Vincent KA, Lenz O, Lauterbach L, Reeve H, Idris Z, Ash P** 2011 „Cofactor regeneration system,” Vereinigtes Königreich Patentanmeldungsnummer.: 1116971.1.

\*zu gleichen Teilen beigetragen



## **Zusammenfassung:**

Die NAD<sup>+</sup>-reduzierende Hydrogenase (SH) aus *Ralstonia eutropha* katalysiert die reversible H<sub>2</sub>-Oxidation in Verbindung mit der Reduktion von NAD<sup>+</sup> in Gegenwart von Sauerstoff. Die bemerkenswerte O<sub>2</sub>-Toleranz des Enzyms wurde zuvor auf eine für [NiFe]-Hydrogenasen ungewöhnliche Struktur des Wasserstoff spaltenden Zentrums zurückgeführt. Diese Hypothese wurde in dieser Arbeit mittels *in situ*-Spektroskopie an SH-haltigen Zellen widerlegt. Das [NiFe]-Zentrum trägt demnach wie in O<sub>2</sub>-sensitiven [NiFe]-Hydrogenasen einen CO- sowie zwei Cyanid-Liganden. Zudem wurde der für [NiFe]-Hydrogenasen typische Ni<sub>3</sub>-C-Zustand identifiziert, der durch einen Hydrid-Brückenliganden zwischen Nickel und Eisen gekennzeichnet ist und wahrscheinlich ein Intermediat im katalytischen Zyklus der SH darstellt.

Um die Untersuchung der aus sechs Untereinheiten und mindestens acht Kofaktoren bestehenden SH zu erleichtern, wurde das Enzym mittels genetischer Methoden in seine beiden Module aufgeteilt. Beide gereinigten Subkomplexe waren katalytisch aktiv mit nur einem minimalen Überpotential. Dies ist notwendig, da die Standardpotentiale von 2H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub> und NAD<sup>+</sup>/NADH sehr nahe beieinander liegen. Das die H<sub>2</sub>-Oxidation katalysierende Hydrogenase-Modul beinhaltet ein FMN-Molekül, welches für die reduktive Reaktivierung des oxidativ modifizierten Zentrums benötigt wird. Das Diaphorase-Modul trägt ebenfalls ein FMN, und die Reduktion von NAD<sup>+</sup> wird von der Anwesenheit von O<sub>2</sub> nicht beeinträchtigt. Das auf einer Graphitelektrode immobilisierte Hydrogenase-Modul wurde dagegen bei hohem Redoxpotential langsam durch Sauerstoff inaktiviert. Die Aktivität konnte durch Einstellung eines Redoxpotentials von unter -170 mV allerdings innerhalb von Sekunden zurückgewonnen werden, auch in Gegenwart von O<sub>2</sub>.

Neben Wasserstoff reagiert das [NiFe]-Zentrum der SH auch mit Sauerstoff und zeigt dabei katalytische Promiskuität: In Gegenwart von 60 % (v/v) Wasserstoff und 40 % (v/v) Sauerstoff im Reaktionsansatz lag das Verhältnis der H<sub>2</sub>-Oxidationsrate zur O<sub>2</sub>-Reduktionsrate bei ungefähr 200:1. Dabei wurde Wasserstoffperoxid im Hydrogenase-Modul freigesetzt. Durch einen in dieser Arbeit entwickelten massenspektrometrischen Ansatz konnte gezeigt werden, dass die SH <sup>18</sup>O<sub>2</sub> reduktiv zu Wasser als Hauptprodukt umsetzt. Als Folge der Sauerstoffreaktion werden vermutlich Sauerstoffmodifikationen am katalytischen Zentrum gebildet, die durch rückläufigen Elektronentransport reduktiv entfernt werden. Die Sauerstofftoleranz der SH basiert somit auf einer kontinuierlichen Reaktivierung des durch Sauerstoff oxidierten [NiFe]-Zentrums.

Aufgrund der außergewöhnlichen Sauerstofftoleranz stellt die SH ein vielversprechendes System für die wasserstoffgetriebene Regeneration von NADH in gekoppelten enzymatischen Reaktionen dar. Da jedoch viele Oxidoreduktasen NADPH benötigen, wurde in dieser Arbeit an der Substraterweiterung der SH gearbeitet. Durch rationale Mutagenese wurden zwei negativ geladene Aminosäuren gegen kleinere, neutrale Reste ausgetauscht. Das entsprechende SH-Derivat war in der Lage, wasserstoffabhängig NADP<sup>+</sup> zu NADPH zu reduzieren, und wies Aktivitäten auf, die vergleichbar sind mit denen der NADP<sup>+</sup>-abhängigen Formiat-Dehydrogenasen. Durch Ganzzellansätze kann die zeitaufwändige und kostenintensive Proteinreinigung vermieden werden. Um die wasserstoffabhängige *in-vivo*-Kofaktorregeneration zu ermöglichen, wurde ein Überexpressionssystem mit insgesamt 13 Genen für die heterologe Produktion der SH in *Pseudomonas putida* konstruiert. Der lösliche Extrakt des rekombinanten *P. putida*-Stammes wies tatsächlich SH-spezifische Aktivität auf. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sind somit sowohl für das molekulare Verständnis der H<sub>2</sub>-abhängigen Katalyse als auch für die biotechnologische Anwendung der O<sub>2</sub>-toleranten SH relevant.

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung:</b> .....	i
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	ii
<b>Abkürzungen</b> .....	vi
1. Einleitung .....	1
1.1 Drei Klassen von Hydrogenasen und deren Aufbau .....	1
1.2 [NiFe]-Hydrogenasen .....	3
1.3 Einteilung der [NiFe]-Hydrogenasen .....	4
1.4 Das [NiFe]-Zentrum und der katalytische Zyklus .....	7
1.5 Die vier unterschiedlichen Hydrogenasen von <i>Ralstonia eutropha</i> .....	11
1.6 Zusammenbau des [NiFe]-Zentrums .....	13
1.7 Sauerstofftoleranz der <i>R. eutropha</i> Hydrogenasen .....	14
1.8 Die NAD <sup>+</sup> -reduzierende Hydrogenase aus <i>R. eutropha</i> .....	15
1.9 Kofaktoren der SH .....	16
1.10 Biotechnologische Anwendung von Hydrogenasen .....	19
1.11 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit .....	20
2. Material und Methoden .....	21
2.1 Bakterienstämme und Plasmide .....	21
2.2 Kultivierung der Bakterien .....	24
2.2.1 Wachstumsmedium .....	24
2.2.2 Bestimmung der Wachstumsparameter .....	25
2.2.3 Zellkultivierung .....	25
2.2.4 Konservierung von Bakterienstämmen .....	26
2.3 Zellfraktionierung und Proteinreinigung .....	27
2.4 Probenanalytik .....	28
2.4.1 Proteinbestimmung .....	28
2.4.2 Bestimmung der Hydrogenase-Aktivität .....	28
2.4.3 Bestimmung der Diaphorase-Aktivität .....	29
2.4.4 Bestimmung der Oxidase-Aktivität .....	29
2.4.5 Kofaktor-Quantifizierung .....	31
2.4.6 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE .....	31
2.4.7 Immunologische Detektion der Proteine .....	32
2.4.8 Aufnahme von UV-Vis-Absorptionsspektren .....	32
2.4.9 Fourier-Transform-Infrarot(FTIR-) Spektroskopie und Fit-Prozedur .....	33

---

2.4.10 EPR-Spektroskopie.....	33
2.4.11 Röntgenabsorptionsspektroskopie .....	34
2.4.12 Elektrochemie.....	34
2.4.13 Kristallisationsansätze.....	35
2.5 DNA-Grundtechniken .....	36
2.5.1 Behandlung von Geräten und Lösungen .....	36
2.5.2 Konzentrationsbestimmung der DNA bzw. RNA .....	36
2.5.3 Restriktionsverdau von DNA .....	36
2.5.4 Dephosphorylierung von DNA.....	36
2.5.5 Ligation von DNA-Fragmenten .....	36
2.6 DNA-Isolierung .....	37
2.7 Plasmidisolierung .....	37
2.8 Elektrophoretische Auftrennung der DNA in Agarosegelen.....	37
2.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	38
2.10 Herstellung kompetenter Zellen .....	38
2.11 Transformation .....	38
2.12 Konjugation .....	38
2.13 Sequenzierung .....	39
2.14 Polymerase-Kettenreaktion .....	39
2.15 Gentechnische Konstruktionen.....	40
2.15.1 SH Expressionsplasmide .....	40
2.15.2 Ortsspezifische Mutagenese .....	42
2.15.3 Genomische Deletionen.....	42
2.16 Chemikalien und Enzyme.....	43
2.17 Dokumentation, Statistik und Datenverarbeitung .....	43
3. Ergebnisse.....	44
3.1 Untersuchung des [NiFe]-Zentrums der SH mit <i>in-situ</i> -EPR- und FTIR-Spektroskopie .....	44
3.1.1 Konstruktion einer RH- und MBH-negativen <i>R. eutropha</i> -Mutante.....	44
3.1.2 In-situ-EPR-Spektroskopie der SH.....	45
3.1.3 In-situ-FTIR-Spektroskopie der SH .....	47
3.2 Überproduktion und Reinigung nativer SH.....	50
3.2.1 Ein Expressionsplasmid für die SH-Produktion.....	50
3.2.2 Mikroaerobe Zellkultivierung für die SH-Überproduktion.....	51

---

3.2.3 Ein optimiertes Protokoll für die Reinigung der SH.....	51
3.2.4 Größenbestimmung der nativen SH.....	53
3.2.5 Versuche zur Strukturaufklärung der SH.....	53
3.2.6 Redoxverhalten des [NiFe]-Zentrums.....	54
3.2.7 Analyse der [FeS]-Cluster und FMN in der SH.....	55
3.3 Das Hydrogenase-Modul der SH.....	57
3.3.1 Ein Expressionsplasmid für die Produktion des Hydrogenase-Moduls der SH...	57
3.3.2 Reinigung des HoxHY-Moduls und dessen katalytische Eigenschaften .....	57
3.3.3 Analyse der Kofaktoren im Hydrogenase-Modul.....	59
3.3.4 Röntgenabsorptionsspektroskopie am HoxHY-Modul.....	61
3.3.5 Elektrochemische Untersuchungen des Hydrogenase-Moduls.....	63
3.3.6 Reaktivierung des HoxHY-Moduls .....	64
3.3.7 Katalytische Präferenz („Bias“).....	68
3.3.8 Produktinhibition durch Wasserstoff.....	69
3.3.9 Sauerstofftoleranz des Hydrogenase Moduls.....	69
3.3.10 Redoxverhalten des [NiFe]-Zentrums im Hydrogenase-Modul .....	72
3.4 Katalytische Eigenschaften des Diaphorase-Moduls.....	76
3.4.1 Funktionalität eines plasmidbasierten Diaphorase-Moduls der SH.....	76
3.4.2 Reinigung des Diaphorase-Moduls.....	76
3.4.3 Biochemische Charakterisierung des HoxFU-Moduls .....	78
3.4.4 Kofaktor-Analyse des HoxFU-Moduls.....	80
3.4.5 Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies .....	85
3.4.6 Elektrochemische Untersuchung des HoxFU-Moduls.....	86
3.4.7 Katalytische Präferenz („Bias“) des Diaphorase-Moduls.....	87
3.4.8 Das HoxFU-Modul setzt in Abwesenheit von Substrat FMN frei.....	89
3.4.9 Inaktivierung von HoxFU bei niedrigen Potentialen .....	89
3.4.10 Affinität des HoxFU-Moduls für NAD(H) .....	90
3.4.11 Endproduktinhibition von HoxFU durch NAD(H).....	91
3.4.12 Die Sauerstofftoleranz des Diaphorase-Moduls .....	93
3.5 Untersuchungen zur Sauerstofftoleranz der SH.....	94
3.5.1 Eingesetzte Derivate für die Experimente zur Sauerstofftoleranz der SH.....	94
3.5.2 Reduktionsmittel und FMN erhöhen die SH-Aktivität.....	95
3.5.3 Sauerstofftoleranz der nativen SH .....	96
3.5.4 Der Sauerstoffreduktions-Aktivität der SH.....	96



---

3.5.5 Superoxid-Produktion durch die SH .....	97
3.5.6 Produktion von Wasserstoffperoxid durch die SH .....	98
3.5.7 Wasserproduktion durch die SH.....	99
3.5.8 Orte der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - und H <sub>2</sub> O-Produktion in der SH.....	101
3.6 Umwandlung der NAD <sup>+</sup> - in eine NADP <sup>+</sup> -Bindestelle .....	102
3.6.1 Konstruktion der HoxF-Derivate und Funktionalitätstest .....	104
3.6.2 Reinigung der SH-Derivate und Bestimmung der Affinität für NAD(P)(H) .....	105
3.7 Heterologe SH-Produktion in <i>Pseudomonas putida</i> .....	108
4. Diskussion .....	111
4.1 Optimierung der SH-Produktion und Reinigung.....	111
4.2 Kofaktorzusammensetzung .....	113
4.3 Kontrovers diskutierte Ergebnisse zur Struktur des [NiFe]-Zentrums der SH.....	114
4.4 Die SH besitzt einen Standard-Satz von zwei CN <sup>-</sup> - und einem CO-Liganden.....	115
4.5 Der katalytische Zyklus am Nickel-Eisen-Zentrum der SH.....	116
4.6 Katalytische Eigenschaften der SH .....	119
4.6.1 NAD(P)(H)-Umwandlung des Diaphorase-Moduls.....	119
4.6.2 Regulationsmechanismen der SH-Aktivität .....	121
4.6.3 Potential-abhängige Effekte auf die Aktivität der SH.....	124
4.6.4 HoxFU produziert Superoxid .....	125
4.6.5 Weitere Reaktionen des Diaphorase-Moduls mit Sauerstoff .....	126
4.6.6 Reaktionen des Hydrogenase-Moduls mit Sauerstoff.....	127
4.7 Durch Sauerstoff hervorgerufene Redoxzustände in der SH.....	129
4.8 Modell der Sauerstofftoleranz der SH .....	131
4.9 Einsatz der SH in der Kofaktorregeneration.....	136
5. Literaturverzeichnis .....	142
6. Anhang .....	159
Danksagung .....	165

---

## Abkürzungen

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
AK	Antikörper
AS	Aminosäure(n)
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BV	Benzylviologen
ddH <sub>2</sub> O	Ultrareinstwasser
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CIP	Alkalische Phosphatase ( <i>calf intestinal phosphatase</i> )
CO	Carbonyl
CN	Cyanid
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DCPK	Dicyclopropylketon
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DT	Dithionit
DTT	Dithiothreitol
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPR	Elektronen-Paramagnetische-Resonanz
EXAFS	extended X-ray absorption fine structure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FGN	Fruktose-Glycerin-Minimalmedium
FN	Fruktose-Minimalmedium
FMN	Flavinmononucleotid
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot-(Spektroskopie)
GGN	Glukose-Glycerin-Minimalmedium
x g	X-fache Erdanziehungskraft
H <sub>2</sub> ase	Hydrogenase
ICP-OES	optische Emissionsspektrometrie mittels induktiv gekoppeltem Plasma
kb	Kilobasen

---

kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
LE	löslicher Extrakt
LB	Lysogeny Broth
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
MBH	membrangebundene Hydrogenase
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	reduzierte Form von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NADPH	reduzierte Form von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
MCS	“multiple cloning site”
ml	Milliliter
mol	$6,022 \times 10^{23}$ Teilchen
MV	Methylviologen
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
OD <sub>xxx</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von xxx nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	“Protein data bank”
PEG	Polyethylenglykol
PGE	“pyrolytic graphite edge”; pyrolytische Graphit-(Elektrode)
PMS	5-Methyl-phenaziniummethylsulfat
RH	regulatorische Hydrogenase
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCE	Standard-Kalomel-Elektrode
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SH	„soluble hydrogenase“; $\text{NAD}^+$ reduzierende Hydrogenase
SHE	Standard-Wasserstoff-Elektrode
t	Zeit
TCA	Trichloressigsäure

Tet	Tetracyclin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TXRF	Totalreflektions-Röntgenfluoreszenz-Analyse
U	Unit (μmol/min)
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifugation
Vis	sichtbares Licht
XAS	Röntgenabsorptionsspektroskopie

## 1. Einleitung

Saubere Energieträger aus erneuerbaren Quellen sind notwendig, um den wachsenden Energieverbrauch in Zukunft ohne große Umweltschäden zu decken. Molekularer Wasserstoff ( $H_2$ ) wird als vielversprechender alternativer Energieträger des postfossilen Zeitalters betrachtet, da die Verbrennung von  $H_2$  mit  $O_2$ , z. B. in einer Brennstoffzelle vergleichsweise viel Energie freisetzt (-286 kJ/mol) und nur das unschädliche Reaktionsprodukt Wasser entsteht. Obwohl Wasserstoff das häufigste Element in der Biosphäre der Erde ist, kommt  $H_2$  nur in geringen Mengen in der Erdatmosphäre vor ( $\sim 0,5$  ppm v/v). Aufgrund der hohen Bindungsenthalpie der H-H-Bindung 436 kJ/mol ist das Wasserstoffmolekül unter gewöhnlichen Bedingungen nicht reaktiv (Gurvich *et al.* 1989). Zur Vermeidung von extremen Reaktionsbedingungen wie hohem Druck und hoher Temperatur ist zur Spaltung von  $H_2$  ein Katalysator notwendig. In Brennstoffzellen wird Platin verwendet, das allerdings nur in begrenzten Mengen verfügbar und daher sehr teuer ist (Bashyam und Zelenay 2006). Die Suche nach günstigen und effizienten Alternativen, die auch stabil gegenüber häufigen Verunreinigungen wie Kohlenstoffmonoxid sind, hat somit eine große Bedeutung für die angewandte Forschung. Die Synthese von alternativen Katalysatoren, die von der Natur inspiriert sind, könnte dieses Problem lösen. (Le Goff *et al.* 2009).

In der Natur wird  $H_2$  zu einem großen Teil durch fermentative Anaerobier freigesetzt. Ebenso wird er als Nebenprodukt der Stickstofffixierung produziert und entsteht darüber hinaus im Rahmen von nichtbiologischen, geochemischen Prozessen. In anoxischen Lebensräumen wird der überwiegende Teil des produzierten  $H_2$  durch z.B. Methanogene, Azetogene oder Sulfatreduzenten verbraucht, so dass nur geringste Mengen in die sauerstoffhaltige Umwelt gelangen, wo sie von Knallgasbakterien umgesetzt werden (Conrad 1996). Alle genannten Organismen enthalten Hydrogenasen, wasserstoffumsetzende Enzyme, die die reversible heterolytische Spaltung von  $H_2$  in zwei Protonen und zwei Elektronen katalysieren (Stephenson und Stickland 1931; Gitlitz und Krasna 1975). Aufgrund des niedrigen Redoxpotentials des Protonen/ $H_2$ -Paares ( $2H^+/H_2$ ,  $E^0 = -0,42$  V bei 1 bar  $H_2$ ) stehen im Fall der Wasserstoffoxidation fast alle bekannten biologischen Elektronenakzeptoren zur Auswahl, um schließlich eine Vielzahl von organischen und anorganischen Substraten zu reduzieren wie z.B.  $CO_2$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$  oder  $O_2$  (Conrad 1996).

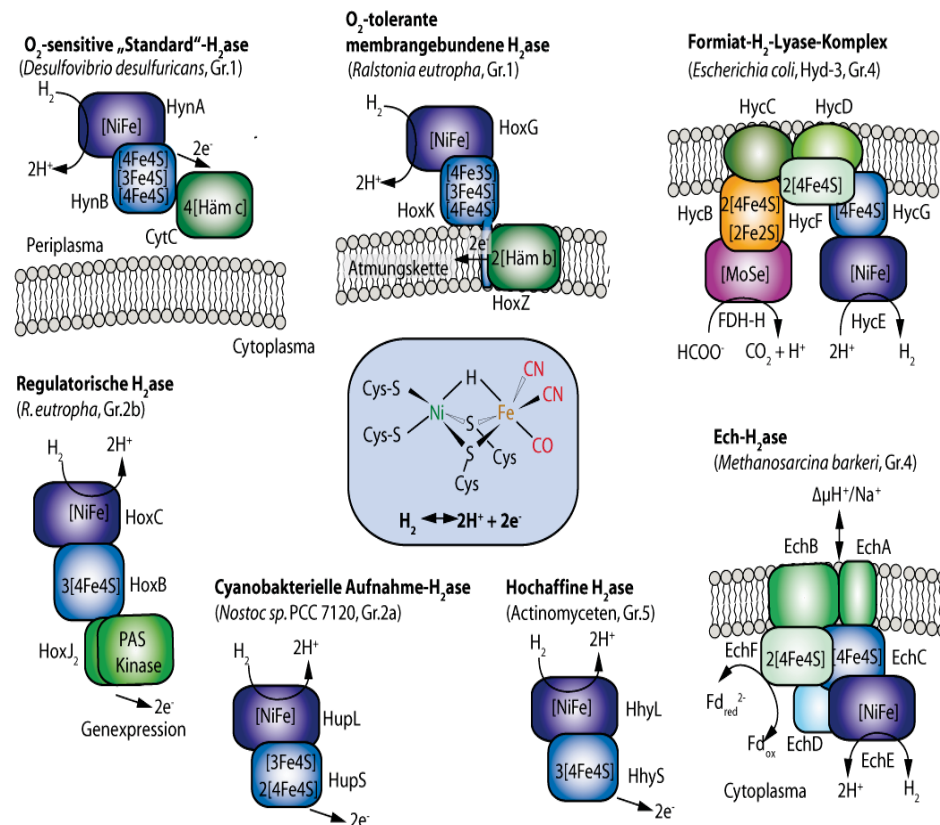
### 1.1 Drei Klassen von Hydrogenasen und deren Aufbau

Die Nutzung von Wasserstoff als Energieträger war höchstwahrscheinlich eine frühe Entwicklung in der Evolution, da die Atmosphäre der jungen Erde wasserstoffreicher als

heute war (Martin und Muller 1998). Heutzutage werden Hydrogenasen in ganz unterschiedlichen Organismen, wie z. B. in Archaeen, Proteobakterien, Actinobakterien, Cyanobakterien und einigen niederen Eukaryoten gefunden, die in Böden, Flüssen, Ozeanen, Tiefseehabitaten und heißen Quellen anzutreffen sind (Vignais und Billoud 2007; Petersen *et al.* 2011). Hydrogenasen werden entsprechend dem Aufbau ihrer aktiven Zentren in drei phylogenetisch nicht miteinander verwandte Klassen eingeteilt, die als Gemeinsamkeit ihrer konvergenten Entwicklung ein „low-spin“  $\text{Fe}^{2+}$  mit mindestens einem Carbonyl(CO)-Liganden besitzen (Vignais *et al.* 2001; Kubas 2007). Die [FeFe]-Hydrogenasen weisen die höchste Wasserstoffproduktionsaktivität auf, in dessen Rahmen überschüssige Reduktionsäquivalente unter anaeroben Bedingungen entfernt werden (Fontecilla-Camps *et al.* 2007; Adams 1990). Die prosthetische Gruppe der [FeFe]-Hydrogenasen, der sogenannte H-Cluster, besteht aus einem [2Fe2S]-Zentrum, das über ein Cystein mit einem [4Fe-4S]-Cluster verbunden ist. Beide Eisenatome des [2Fe2S]-Subclusters sind mit je einem CO- und einem Cyanid-(CN<sup>-</sup>)Liganden komplexiert; wobei ein drittes CO und eine Dithiolate-Brücke mit einem Di(methyl)amin beide Fe-Atome miteinander verbrückt (Peters *et al.* 1998; Silakov *et al.* 2009). Bei den [NiFe]-Hydrogenasen erfolgt die katalytische Umwandlung von Wasserstoff an einem heterodinuklearem [NiFe]-Zentrum, das von vier Cystein-Schwefeln an die Proteinmatrix gebunden ist, wobei zwei Cysteine das Fe- und Ni-Atom verbrücken, die restlichen zwei als terminale Ni-Liganden koordinierend fungieren (Volbeda *et al.* 1995). Zusätzlich sind an das Eisenatom ein CO- und zwei CN-Liganden gebunden (Happe *et al.* 1997). Der Elektronen-Transfer zu oder von dem aktiven Zentrum erfolgt durch [Fe-S]-Cluster. Die [NiFe]-Hydrogenasen katalysieren im Gegensatz zu den [FeFe]-Hydrogenasen eher die H<sub>2</sub>-Oxidation als die H<sub>2</sub>-Produktion, obwohl einige Ausnahmen vorkommen (siehe unten). Die meisten Vertreter dieser Enzymklasse werden durch Sauerstoff reversibel inaktiviert, wobei einige sauerstofftolerante Vertreter dieser Enzymklasse bekannt sind (Vignais und Billoud 2007). [Fe]-Hydrogenasen katalysieren den Hydridtransfer auf das Substrat Methenyltetrahydromethanopterin in methanogenen Archaeen (Zirngibl *et al.* 1992). Dieses lichtensitive Enzym enthält ein Zentrum mit Eisen, das mit zwei CO Liganden, mit einem Guanylylpyridinol-Derivat über eine Azyl-Gruppe und über ein sp<sup>2</sup>-hybridisiertes Stickstoff koordiniert, und über ein Cystein mit der Proteinmatrix verbunden ist (Shima *et al.* 2008; Shima *et al.* 2011). Die auch als H<sub>2</sub>-produzierende Methylenetetrahydromethanopterin-Dehydrogenasen (Hmd) bezeichnete Enzymklasse besitzt keinen [Fe-S]-Cluster und wird bei Nickelmangel gebildet (Thauer 1998). In der vorliegenden Arbeit wird eine [NiFe]-Hydrogenase näher untersucht, daher wird der Fokus auf diese Enzymklasse gesetzt.

## 1.2 [NiFe]-Hydrogenasen

Die [NiFe]-Hydrogenasen sind aufgrund ihrer sauerstofftoleranten Vertreter von hohem Interesse für biotechnologische Anwendungen und sie sind in Bakterien und Archaeen weit verbreitet. Sie bestehen aus mindestens zwei Untereinheiten, eine etwa 60 kDa große Untereinheit mit dem [NiFe]-Zentrum und eine kleinere (ca. 30 kDa) Untereinheit mit mindestens einem [4Fe-4S]- oder einem [4Fe3S]-Cluster nahe an dem aktiven Zentrum als proximales Eisen-Schwefel-Zentrum (Vignais und Billoud 2007; Fritsch *et al.* 2011). Die großen und kleinen Untereinheiten weisen dabei eine Sequenzhomologie zu der Nqo4 bzw. der Nqo6 Untereinheit von der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I) aus *Thermus thermophilus* auf (Albracht 1993). Aufgrund der bekannten Struktur des Komplex I aus *Thermus thermophilus* wird deren Nomenklatur im Nachfolgenden eingesetzt (Sazanov und Hinchliffe 2006). Die Kristallstrukturen der *Allochromatium vinosum* und *Desulfovibrio gigas* [NiFe]-Hydrogenasen repräsentieren die Struktur der sauerstoffsensitiven, membrangebundenen „Standard“-Hydrogenasen, die sich auf der periplasmatischen Seite der cytoplasmatischen Membran befinden und deren große und kleine Untereinheiten ein globuläres Heterodimer bilden (Abbildung 1 oben links) (Volbeda *et al.* 1995; Ogata *et al.* 2010). In der kleinen Untereinheit ist das Elektronentransport-Relais mit einem medialen [3Fe4S]-Cluster und einem distalen [4Fe4S]-Cluster verlängert, um die bei der H<sub>2</sub>-Oxidation entstehenden Elektronen auf einen Elektronenakzeptor, oft ein Cytochrom, zu übertragen. Das aktive Zentrum der [NiFe]-Hydrogenasen liegt tief im Inneren der großen Untereinheit verborgen und ist über einen hydrophoben Gaskanal sowie vermutliche Protonentransferwege mit der Proteinoberfläche verbunden (Montet *et al.* 1997; Volbeda *et al.* 2002).

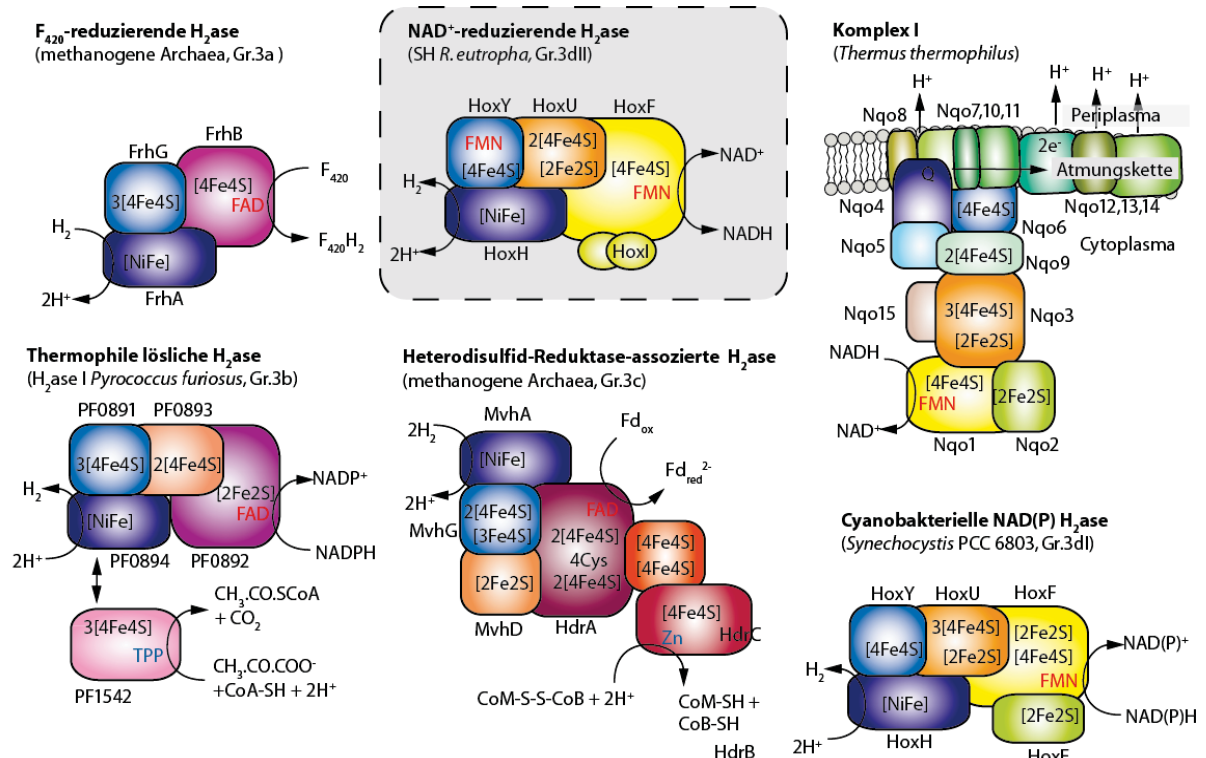


**Abbildung 1: Übersicht der [NiFe]-Hydrogenasen (H<sub>2</sub>ase) der Gruppen 1, 2, 4 und 5 mit Aufbau des [NiFe]-Zentrums.** Die exemplarischen Vertreter aus jeder Gruppe sind schematisch abgebildet. Die großen und die kleinen Hydrogenaseuntereinheiten sind dunkel- bzw. hellblau gekennzeichnet, ebenso die bevorzugte Reaktionsrichtung. Viele Hydrogenasen formen Multimere, die RH bildet einen (HoxBC)<sub>2</sub>HoxJ<sub>4</sub> Komplex und die MBH ein Hox(GKZ)<sub>3</sub> Homotrimer (Buhrke *et al.* 2004; Frielingsdorf *et al.* 2011). Bei der RH sprechen Sequenzvergleiche und neuere Mößbauer Spektroskopie für drei [4Fe4S]-Cluster (Oliver Lenz persönliche Kommunikation). Die Kofaktorenzusammensetzung des Formiat-Hydrogenlysase-Komplexes (Forzi und Sawers 2007) basiert auf Sequenz- und Strukturvergleichen zu Komplex I (Efremov und Sazanov 2012), dabei sind HycF als auch EchF homolog zu Nqo9 und der N-terminale Bereich von HycB als auch HoxU homolog zu Nqo3. Die Interaktion der SHI aus *P. furiosus* mit der Pyruvate-Ferredoxin-Oxidoreductase (PF1542) tritt mit der heterodimeren Form (PF0894+PF0893) der SHI auf (Hopkins *et al.* 2011). Eine Interaktion der cyanobakteriellen Aufnahme-Hydrogenase mit einer membranständigen Untereinheit (HupC) wird vermutet (Tamagnini *et al.* 2007). Abkürzungen: Fd: Ferredoxin mit zwei [4Fe4S]-Clustern, FDH-H: Formiat-Dehydrogenase H mit Molybdoseleno(MoSe)-Kofaktor.

### 1.3 Einteilung der [NiFe]-Hydrogenasen

Aufgrund der Sequenzähnlichkeit und Funktion können die [NiFe]-Hydrogenasen in fünf Gruppen unterteilt werden (Vignais und Billoud 2007; Constant *et al.* 2011; siehe Abbildung 1). Für eine Übersicht der [NiFe]-Hydrogenasen und deren katalysierten Reaktionen siehe Abbildung 1 und 2. Die Gruppe 1 beinhaltet die bereits erwähnten membrangebundenen, H<sub>2</sub>-oxidierenden [NiFe]-Hydrogenasen, die Gruppe 2 die cyanobakteriellen H<sub>2</sub>-oxidierenden Hydrogenasen, die den während der Stickstofffixierung freigesetzten Wasserstoff wieder oxidieren, sowie die H<sub>2</sub>-sensierende Hydrogenasen, die die Expression von Hydrogenasegenen aktivieren (siehe Abbildung 1 links unten).





**Abb. 2: Übersicht [NiFe]-Hydrogenasen aus Gruppe drei.** Jeweils ein exemplarischer Vertreter aus jeder Gruppe ist schematisch abgebildet. Die in dieser Studie eingesetzte NAD<sup>+</sup>reduzierende Hydrogenase (SH) aus *R. eutropha* besonders hervorgehoben. Die Ähnlichkeit der Hydrogenaseuntereinheiten mit den entsprechenden Untereinheiten aus Komplex I ist farblich gekennzeichnet (Efremov *et al.* 2010). Die cyanobakterielle NAD(P)-abhängige Hydrogenase (Schmitz *et al.* 2002) und die NAD<sup>+</sup> reduzierende Hydrogenase aus *R. eutropha* bilden Homodimere. Der heterodimere Subkomplex (PF0894+PF0893) der SH I aus *Pyrococcus furiosus* kann mit der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreductase (PF1542) einen Komplex bilden (Hopkins *et al.* 2011). Für weitere Beschreibungen siehe Abbildungsbeschreibung 1 und für Details zu Hydrogenasen aus methanogenen Organismen siehe Thauer *et al.* 2010. Abkürzungen: CoM-SH, CoB-SH, CoA-SH Coenzyme M, B bzw A mit Thiol Gruppe; Fd, Ferredoxin mit zwei [4Fe4S]-Clustern; TPP Thiamine Pyrophosphat.

Die bidirektionalen cytoplasmatischen [NiFe]-Hydrogenasen sind in Gruppe 3 zusammengefasst, wobei das heterodimere Hydrogenase-Modul mit weiteren Untereinheiten assoziiert ist, um lösliche Kofaktoren wie NAD (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid), NADP (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat), F<sub>420</sub> (8-Hydroxy-5-Desazaflavin) oder das Heterodisulfid aus Coenzym M und B für Redoxreaktionen zu verwenden (siehe Abbildung 2). Die Gruppe 3-Hydrogenasen funktionieren bidirektional, d. h. sie können sowohl reduzierte Kofaktoren reoxidieren und Protonen als Elektronenakzeptoren zur H<sub>2</sub>-Produktion benutzen als auch H<sub>2</sub> oxidieren, wobei die meisten Hydrogenasen allerdings eine Präferenz für eine Reaktionsrichtung besitzen. Viele Mitglieder dieser Gruppe werden in Archaeen gefunden. Dazu gehören die heterotrimeren F<sub>420</sub>-Hydrogenasen, die freigesetzten Wasserstoff reoxidieren (Gruppe 3a, Abbildung 2 links oben) und die Elektronen in die energiekonservierende Elektronentransportkette transferieren, die heterotetrameren löslichen Hydrogenasen von Hyperthermophilen (Gruppe 3b, Abbildung 2 links unten) und die Heterodisulfide-Reduktase-assoziierten Hydrogenasen aus Methanogenen (Gruppe 3c,

Abbildung unten mittig; Stojanowic *et al.* 2003). Bidirektionale NAD(P)-abhängige Hydrogenasen (Gruppe 3d) kommen in Proteobakterien und Cyanobakterien vor. Deren Hydrogenase-Modul ist mit einem zusätzlichen NADH-Akzeptor-Oxidoreduktase- (Diaphorase)-Modul verbunden, das die reversible Spaltung von Wasserstoff mit der reversiblen Reduktion von  $\text{NAD(P)}^+$  koppelt. Der Diaphorase-Subkomplex besteht aus mindestens zwei Untereinheiten, HoxF und HoxU, die ausgeprägte Sequenzähnlichkeit zu dem peripheren Teil von Komplex I aus der Atmungskette (siehe Abbildung 2 oben rechts) sowie zu  $\text{NAD}^+$ -reduzierenden Formiatdehydrogenasen und [FeFe]-Hydrogenasen besitzen (Pilkington *et al.* 1991; Schmitz *et al.* 1995; Cramm 2009). Die bidirektionalen Hydrogenasen können weiter in zwei Gruppen unterteilt werden, die sich in Untereinheit- und Kofaktorzusammensetzung sowie ihrer spezifischen physiologischen Funktion unterscheiden. Die sauerstoffsensitiven, cyanobakteriellen

, bidirektionalen Hydrogenasen (Gruppe 3dI, Abbildung 2 rechts unten), die auch in Schwefelpurpurbakterien vorkommen, besitzen ein Diaphorase-Modul mit einer zusätzlichen HoxE-Untereinheit, die in Membran-Wechselwirkungen beteiligt sein könnte. Sie sind wichtig, um überschüssige Reduktionsäquivalente aus der Fermentation und der Photosynthese durch Wasserstoffproduktion zu entsorgen (Stal und Moezelaar 1997; Appel *et al.* 2000). Da Untereinheiten des Komplex I in Cyanobakterien fehlen, wurde angenommen, dass das Diaphorase-Modul diese substituieren könnte (Appel und Schulz 1996). Dies erscheint jedoch eher unwahrscheinlich, da das Fehlen einer funktionalen bidirektionalen Hydrogenase nicht das Zellwachstum beeinträchtigt (Boison *et al.* 1998; Boison *et al.* 1999). Die zweiten Gruppe der bidirektionalen Hydrogenasen (Gruppe 3dII) besitzen keine HoxE-Untereinheiten und kommen in dem Schwefelpurpurbakterium *Thiocapsa roseopersicina*, im aeroben Actinobakterium *Rhodococcus opacus* MR11 und dem  $\beta$ -Proteobakterium *Ralstonia eutropha* H16 vor, siehe Abbildung 2 zentral oben (Maroti *et al.* 2010; Schneider und Schlegel 1976; Schneider *et al.* 1984).

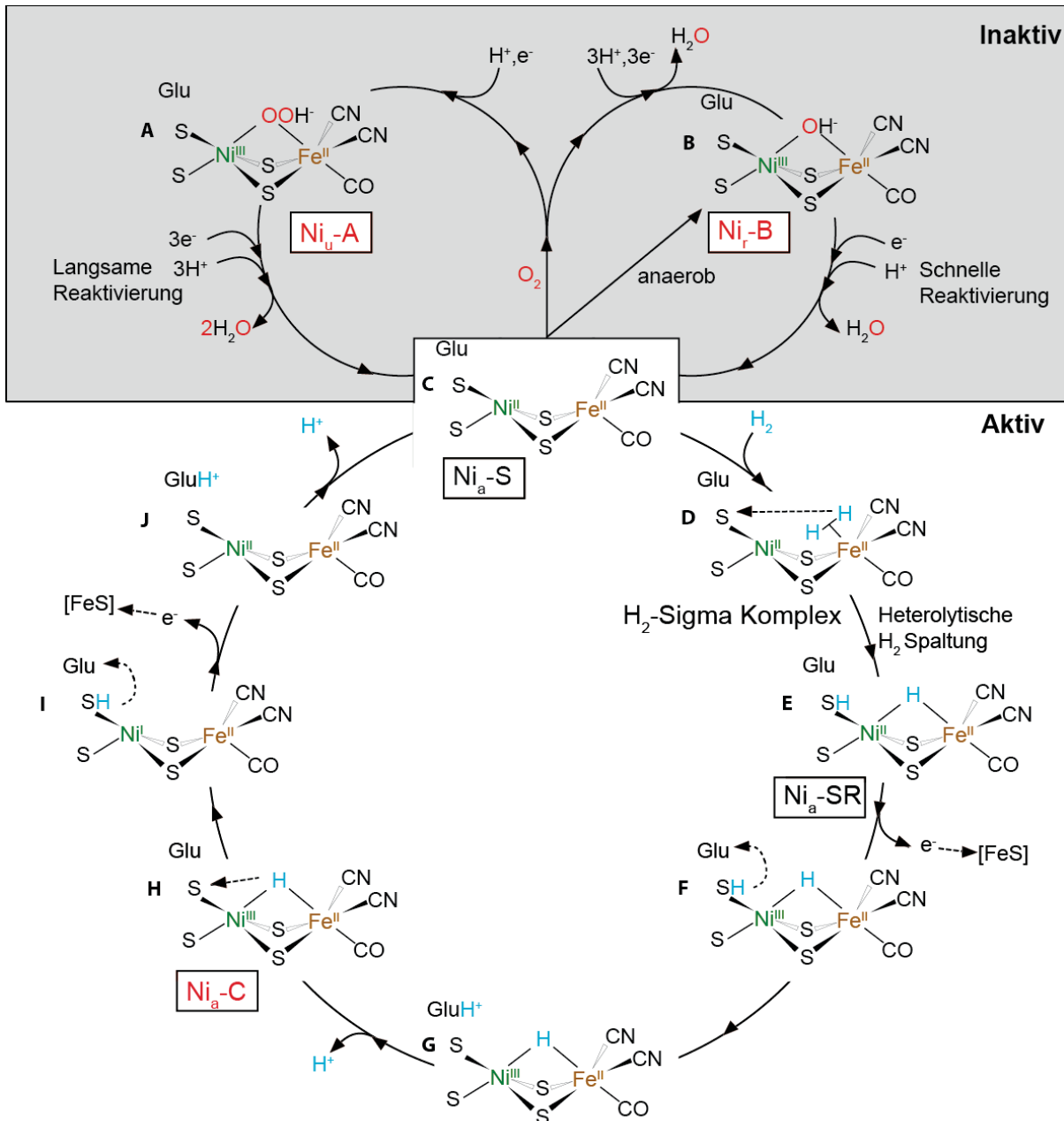
Die heteromultimeren Enzyme (sechs Untereinheiten oder mehr) der Gruppe 4 können überschüssige Reduktionsäquivalente in Form von Wasserstoff durch anaerobe Oxidation von C-1 Verbindungen mit niedrigem Redoxpotential, wie CO oder Formiate entfernen oder im Falle der Ech-Hydrogenasen Energie in Form eines Ionengradienten konservieren (siehe Abbildung 1, rechte Seite; Vignais und Billoud 2007). Hydrogenase 3 aus *Escheria coli* ist der Prototyp dieser Gruppe und katalysiert eine Teilreaktion des Formiat-Abbaus zu  $\text{H}_2$  und  $\text{CO}_2$  (Sawers 2005). Zu der Gruppe 5 gehört die phylogenetische Gruppe der hochaffinen [NiFe]-

Hydrogenasen, die atmosphärische Konzentrationen von  $H_2$  oxidieren können (Constant *et al.* 2011).

#### 1.4 Das [NiFe]-Zentrum und der katalytische Zyklus

Für [NiFe]-Hydrogenasen konnte durch infrarotspektroskopische Untersuchungen nachgewiesen werden, dass CO- und CN-Liganden Teil des katalytischen Zentrums sind (Happe *et al.* 1997). Eine Röntgenstrukturanalyse zeigte, dass diese das Eisen im [NiFe]-Zentrum koordinieren (Volbeda und Fontecilla-Camps 2005). Der spektrochemischen Reihe entsprechend bewirken die CO- und CN-Liganden eine starke Ligandenfeldaufspaltung. Daher wird vermutlich das Eisenatom unter Beibehaltung der Oxidationsstufe +II in einem diamagnetischen ( $S = 0$ ) „low-spin“ Zustand gehalten (Armstrong und Fontecilla-Camps 2008). Der CO-Ligand, der die Elektrophilität der Bindungsstelle für Wasserstoff erhöht, wurde als wichtig, sowohl für die reversible molekulare Bindung von Wasserstoff, als auch für dessen heterolytische Spaltung, angesehen (Kubas 2007). Modellkomplexe von  $Fe^{II}$ -Thiolatkomplexen deuteten darauf hin, dass CN-Liganden die Bindung von CO erleichtern (Rauchfuss *et al.* 2001). Eine alternative Rolle für die Cyanid-Liganden könnte sein, dass sie das Redoxpotential des [NiFe]-Zentrums für die  $H_2$ -Umwandlung erniedrigen (Kubas 2007). Zusätzlich zu den vier koordinierenden Cysteinen sind weitere Aminosäuren für die Wasserstoff-Umwandlung am [NiFe]-Zentrum wichtig, dabei ist das Glutamat an der Aminosäureposition 23 in der großen Hydrogenaseuntereinheit von *D. gigas* zu erwähnen, das für den Protonentransfer von bzw. zum [NiFe]-Zentrum essentiell ist, siehe Abbildung 3 (Dementin *et al.* 2004). Das genannte Glutamat weist eine starke Wasserstoffbindung zu einem der terminalen Nickel-koordinierenden Cysteine auf, das höchstwahrscheinlich deshalb protoniert vorliegt (Garcin *et al.* 1999).

Das [NiFe]-Zentrum durchläuft während der Reaktivierung und der Katalyse mehrere Redoxzustände, die mit verschiedenen spektroskopischen Verfahren in Standard-Hydrogenasen untersucht wurden. Dabei ist das Nickel-Atom die redoxaktive Spezies in dem Heterobimetall-Zentrum und durchläuft die Redoxzustände  $Ni^{II}$ ,  $Ni^{III}$  und vermutlich  $Ni^I$ , wobei sich Eisen kontinuierlich in dem Redoxzustand  $Fe^{II}$  befindet (Dole *et al.* 1997). Vergleichbare Nickel-enthaltende aktive Zentren besitzen die Methyl-Koenzym M Reduktase, die Acetyl-S CoA Synthase oder CO-Dehydrogenase (Darnault *et al.* 2003; Scheller *et al.* 2010; Dobbek *et al.* 2001).



**Abb. 3: Modell der postulierten katalytischen Zyklen für die  $\text{H}_2$ -Umwandlung (unten) und der oxidativen Inaktivierung (oben).** Abhängig von der Verfügbarkeit von Elektronen und Protonen wird entweder der  $\text{Ni}_r\text{-B}$ - oder der  $\text{Ni}_u\text{-A}$ -Zustand gebildet. Die  $\text{Ni}_r\text{-B}$ -Form kann auch durch anaerobe Oxidation gebildet werden. Gezeigt sind lediglich die Schwefelatome (S) der koordinierenden Cysteine. Das Glutamat (Glu) befindet sich an Position 25 und das protonenakzeptierende Cystein an Position 543 in der großen Untereinheit der Hydrogenase von *D. gigas*. Gestrichelte Linien deuten Protonen- bzw. Elektronentransferprozesse an. Die Intermediate des katalytischen Zyklus beruhen unter anderem auf DFT-Berechnungen, EPR- und FTIR-Spektroskopie sowie entsprechenden Untersuchungen an Modellkomplexen (nach Siegbahn *et al.* 2007 und Armstrong *et al.* 2009, modifiziert). EPR-aktive und -inaktive Nickel-Zustände sind rot bzw. schwarz markiert ( $\text{Ni}_u$  = „nickel unready“,  $\text{Ni}_r$  = „nickel ready“,  $\text{Ni}_a$  = „nickel active“).

Durch EPR („electron paramagnetic resonance“)-Spektroskopie kann das  $[\text{NiFe}]$ -Zentrum der Hydrogenasen untersucht werden. Durch Ein-Elektronen-Übertragungen können die EPR-inaktiven  $\text{Ni}^{\text{II}}$ -Zustände  $\text{Ni-S}$  („S“ilent),  $\text{Ni-SR}$  („R“educed), zu paramagnetischen, EPR-aktiven,  $\text{Ni}^{\text{III}}$ -Zuständen im Falle von  $\text{Ni}_u\text{-A}$ ,  $\text{Ni}_r\text{-B}$ ,  $\text{Ni}_a\text{-C}$  oder  $\text{Ni}^{\text{I}}$  im Falle von  $\text{Ni-L}$  umgewandelt werden. Mit der Infrarotspektroskopie können zusätzlich zu den

paramagnetischen auch die diamagnetischen Redoxzustände des katalytischen Zentrums anhand charakteristischer Streckschwingungen der drei anorganischen Liganden identifiziert werden (deLacey *et al.* 1997; De Lacey *et al.* 2007). Die  $\text{Fe}(\text{CO})(\text{CN})_2$ -Einheit des aktiven Zentrums führt zu drei distinkten Infrarot-Absorptionen, die der Carbonyl-Streckschwingung und den symmetrischen und antisymmetrischen Streckschwingungen der beiden gekoppelten Cyanid-Liganden entspricht (Happe *et al.* 1997). Die exakten Bandenpositionen der Streckschwingungen von den drei diatomaren Liganden sind aufgrund ihrer  $\pi$ -Akzeptor- und  $\delta$ -Donor-Eigenschaften empfindlich gegenüber Änderungen der Elektronendichte sowie der Ligandierung des  $[\text{NiFe}]$ -Zentrums (Bagley *et al.* 1995; Happe *et al.* 1997; Darensbourg *et al.* 2000). Diese Änderungen können durch IR-Spektroskopie als Positionsänderungen der entsprechenden Absorptionsbanden verfolgt werden. In der Regel tauchen CN-Streckschwingungen als Absorptionsbanden im Bereich zwischen  $2100$  und  $2040\text{ cm}^{-1}$  auf, während CO-Streckschwingungen im Bereich zwischen  $1970$  und  $1900\text{ cm}^{-1}$  zu detektieren sind (De Lacey und Fernández 2007). Streckschwingungen bei höheren Frequenzen korrelieren mit einer Erniedrigung der Elektronendichte am Eisenatom (Darensbourg *et al.* 2000). Im Vergleich zu CN-Liganden sind die Schwingungen des CO-Liganden aufgrund der stärkeren  $\pi$ -Akzeptor-Eigenschaft sensitiver für Elektronendichteänderungen. Daher stellt die Absorption des CO-Liganden einen besseren Indikator für den Redoxzustand des  $[\text{NiFe}]$ -Zentrums als die Absorptionen der CN-Liganden dar (De Lacey und Fernández 2007; Darensbourg *et al.* 2000). Zusätzlich zu dem Substrat Wasserstoff reagiert das  $[\text{NiFe}]$ -Zentrum mit dem Inhibitor Sauerstoff. In „Standard“  $[\text{NiFe}]$ -Hydrogenasen wurden zwei inaktive oxidierte Redoxzuständen mit  $\text{Ni}^{\text{III}}$  nachgewiesen. Die  $\text{O}_2$ -Exposition unter elektronenreichen Bedingungen führt hauptsächlich zu dem "ready"  $\text{Ni}_\text{r}\text{-B}$  Zustand (Abbildung 3B), der auch anaerob bei Potentialen über  $-200\text{ mV}$  gebildet werden kann (Vincent *et al.* 2007). Die  $\text{O}_2$ -Behandlung unter Elektronenmangel-Bedingungen ruft vor allem den "unready"  $\text{Ni}_\text{u}\text{-A}$ -Zustand hervor (Abbildung 3A) (Volbeda *et al.* 2002; Ogata *et al.* 2005; Cracknell *et al.* 2009). Die beiden Spezies mit für  $\text{Ni}^{\text{III}}$  ( $S=1/2$ ) charakteristischen EPR Signalen weisen unterschiedliche Aktivierungs-Kinetiken auf. Für die  $\text{Ni}_\text{r}\text{-B}$ -Spezies wurde ein Hydroxo-Ligand in der verbrückenden Position zwischen den beiden Metallen nachgewiesen, der in Gegenwart von Wasserstoff schnell reaktiviert werden kann (Sekunden bis Minuten) (Volbeda, Martin *et al.* 2005; van Gastel, Stein *et al.* 2006). Dagegen kann die Reaktivierung des  $\text{Ni}_\text{u}\text{-A}$  Redoxzustandes mehrere Stunden dauern (Fernandez *et al.* 1985). Dabei wird ein Hydroperoxo-Ligand in der verbrückenden Position vermutet. Ein-Elektronen-Reduktionen der  $\text{Ni}_\text{u}\text{-A}$ - bzw.  $\text{Ni}_\text{r}\text{-B}$ -Zustände führen zu den EPR-inaktiven  $\text{Ni}_\text{u}\text{-S}$  („S“ilent)



bzw.  $\text{Ni}_\text{r}$ -S-Zuständen (jeweils  $\text{Ni}^{\text{II}}$ ). Höchstwahrscheinlich bleibt der Brückenligand in diesen Zuständen erhalten und muss für die vollständige Aktivierung des Enzyms entfernt werden.  $\text{Ni}_\text{r}$ -S wird durch die Freisetzung von Wasser aktiviert und geht dabei in den „active“  $\text{Ni}_\text{a}$ -S ( $\text{Ni}^{\text{II}}$ ) mit einer freien Koordinationsstelle zwischen den beiden Metallen über (Abbildung 3C) (Ogata *et al.* 2005).

Für den katalytischen Zyklus wurden verschiedene Modelle vorgeschlagen. Ein Modell für die heterolytische Wasserstoffspaltung ist in Abbildung 3 gezeigt. Es basiert auf Strukturanalysen, spektroskopisch detektierten Zuständen, DFT-Berechnungen (Density functional theory) und berücksichtigt ein terminales Cystein als primärer Protonenakzeptor sowie ein Glutamat für den Protonentransfer (Siegbahn *et al.* 2007). Als erster Schritt wird die Bindung von Wasserstoff an das sich im  $\text{Ni}_\text{a}$ -S-Zustand befindliche  $[\text{NiFe}]$ -Zentrum angesehen (Abbildung 3D), der vermutlich eine freie Koordinationsstelle zwischen Nickel und Eisen aufweist (Niu *et al.* 1999). Aufgrund von DFT-Berechnungen und der Affinität von „low spin“-d-Metallen für molekularen Wasserstoff wird angenommen, dass das  $\text{Fe}^{\text{II}}$  des aktiven Zentrums  $\text{H}_2$  bindet (Siegbahn *et al.* 2007; Kubas 2007). Eine Bindung des Wasserstoffs an das Nickel ist allerdings ebenfalls möglich, da der hydrophobe Gaskanal am Nickel endet und Nickel den Inhibitor CO bindet (Montet *et al.* 1997; Ogata *et al.* 2002). In den meisten Modellen für den katalytischen Zyklus wird von einer heterolytischen Spaltung des Wasserstoffes ausgegangen, bei der ein terminales Cystein als Protonenakzeptor dient und reversibel ein Hydrid zwischen Nickel und Eisen gebunden wird (Siegbahn *et al.* 2007). Der resultierende reduzierte  $\text{Ni}_\text{a}$ -SR-Zustand ist EPR-inaktiv ( $\text{Ni}^{\text{II}}$ ) (Bleijlevens *et al.* 2004; Volbeda *et al.* 2005). Bis zu drei unterschiedliche pH-Wert-abhängige Formen von  $\text{Ni}_\text{a}$ -SR sind identifiziert worden, die sich in der Protonierung unterscheiden könnten (Volbeda *et al.* 2005; Fichtner *et al.* 2006). Des Weiteren könnten auch Liganden wie  $\text{H}^-$  oder  $\text{H}_2$ , die entweder an das Nickel oder Eisen gebunden sind, eine Erklärung für die verschiedenen  $\text{Ni}_\text{a}$ -SR-Zustände sein (Ogata *et al.* 2009).

Die anschließende Oxidation des Nickelions und Übertragung eines Elektrons auf die  $[\text{Fe-S}]$ -Cluster ergibt den paramagnetischen  $\text{Ni}_\text{a}$ -C-Zustand (Abbildung 3H,  $\text{Ni}^{\text{III}}$ ,  $S = \frac{1}{2}$ ; De Lacey *et al.* 2007). Durch EPR-spektroskopische Untersuchungen konnte in diesem Zustand ein Hydrid ( $\text{H}^-$ ) als Brückenligand nachgewiesen werden, was im Zusammenhang mit pH-Wert-abhängigen Messungen und H/D-Austauschexperimenten als Beweis für die heterolytische Spaltung von molekularem Wasserstoff im  $[\text{NiFe}]$ -Zentrum gesehen wird (Lespinat *et al.* 1986; Brecht *et al.* 2003). Bei kryogenen Temperaturen reagiert der  $\text{Ni}_\text{a}$ -C-Zustand unter Beleuchtung mit weißem Licht zu einer weiteren EPR-detektierbaren Spezies ( $\text{Ni-L}$ ) (van der

Zwaan *et al.* 1985), die vermutlich über den reversiblen Transfer eines Protons aus dem Brückenliganden in die nähere Umgebung des aktiven Zentrums gebildet wird (Brecht *et al.* 2003). Obwohl dieser Zustand normalerweise unter nicht-physiologischen Bedingungen entsteht, wird ein ähnliches, transientes  $\text{Ni}^{\text{I}}$ -Intermediat als Teil des katalytischen Wasserstoffzyklus vorgeschlagen (Abbildung 3I; Pardo *et al.* 2006; Siegbahn *et al.* 2007; Lill und Siegbahn 2009). Die  $\text{Ni}_a\text{-S}$ -Spezies wird durch eine weitere Oxidation und Übertragung eines Elektrons auf die  $[\text{Fe-S}]$ -Cluster regeneriert.

Als alternatives Modell wird eine initiale heterolytische Spaltung von  $\text{H}_2$  mit einer anschließenden oxidativen Addition von  $\text{H}_2$  postuliert, der zu dem  $\text{Ni}_a\text{-X}$ -Zustand mit zwei Hydriden, eines verbrückend zwischen Nickel und Eisen und das zweite terminal gebunden an Nickel, führt und ein formales  $\text{Ni}^{\text{III}}$  aufweist (Lill und Siegbahn 2009). Als Initiation der oxidativen Addition wird u.a. eine  $[\text{NiFe}]$ -Spezies mit einem  $\text{Ni}^{\text{I}}$  vorgeschlagen, die eine Metallbindung zwischen Nickel und Eisen besitzt (Babtie *et al.* 2009).

### 1.5 Die vier unterschiedlichen Hydrogenasen von *Ralstonia eutropha*

Das Knallgasbakterium *Ralstonia eutropha* H16 ist ein strikt respiratorisches, fakultativ lithoautotrophes Bakterium, das ubiquitär in Böden und Süßwasser vorkommt und erstmals 1962 von Erika Wilde isoliert wurde (Wilde 1962). Das peritrich begeißelte, stäbchenförmige  $\beta$ -Proteobakterium kann sowohl chemolithoautotroph mit  $\text{CO}_2$  als Kohlenstoffquelle, Wasserstoff als Energiequelle und  $\text{O}_2$  als terminalen Elektronenakzeptor als auch auf organischen Kohlenstoffquellen, wie z. B. Fruktose, Glycerin, aromatischen Verbindungen oder organischen Säuren heterotroph wachsen (Johnson und Stanier 1971; Kersters *et al.* 1984). Unter anaeroben Bedingungen kann das Bakterium zur Denitrifikation wechseln und Nitrat als alternativen Elektronenakzeptor einsetzen (Pfitzner und Schlegel 1973). Organischer Kohlenstoff wird unter Sauerstoff-, Stickstoff- oder Phosphatmangel in Form von Polyhydroxybutyrat (PHB) gebunden, das als biologisch abbaubarer thermoplastisches Material bekannt wurde (A. 1992; Lee und Park 2005). Während des lithoautotrophen Wachstums wird  $\text{CO}_2$  durch den Calvin-Benson-Bassham-Zyklus (CBB) fixiert und der molekulare Wasserstoff wird durch zwei energiekonservierende Hydrogenasen in *R. eutropha* oxidiert (Bowien und Kusian 2002). Das Genom besteht aus drei zirkulären Replikons, nämlich zwei Chromosomen und einem Megaplasmid pHG1, und umfasst insgesamt 6626 Gene, wobei die Gene des Wasserstoffmetabolismus ausschließlich auf dem Megaplasmid lokalisiert sind (Pohlmann *et al.* 2006). Eine der beiden energiekonservierenden Hydrogenasen ist die cytoplasmatische  $\text{NAD}^+$ -reduzierende Hydrogenase (soluble hydrogenase; SH). Sie gehört zur Gruppe 3dII und reduziert  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}$  durch Elektronen, die aus der Wasserstoffoxidation stammen.

(Burgdorf *et al.* 2005). Während des lithoautotrophen Wachstums wird NADH für Kohlenstofffixierung durch den CBB-Zyklus benötigt und kann durch Transhydrogenasen für anabole Stoffwechselwege zu NADPH umgewandelt werden. Des Weiteren können Reduktionsäquivalente in Form von NADH durch Komplex I der Atmungskette reoxidiert werden, um einen Protonengradienten aufzubauen, so dass anschließend ATP produziert wird (Cramm 2009). Herrscht dagegen ein Überschuss von NADH im Cytoplasma unter anaeroben Bedingungen, kann die SH die reverse Reaktion, die  $H^+$ -Reduktion zu Wasserstoff durch NADH Oxidation katalysieren und damit als ein Redoxventil fungieren (Kuhn *et al.* 1984).

Die zweite energiekonservierende  $H_2$ ase ist die periplasmatisch orientierte, membrangebundene Hydrogenase (MBH), die mit der SH generell ko-synthetisiert wird. Sie gehört zur Gruppe 1 der [NiFe]-Hydrogenasen. Elektronen aus der Oxidation von  $H_2$  werden vom Heterodimer HoxGK über ein Cytochrom *b* (HoxZ) in den Chinonpool der Atmungskette geleitet (Schink und Schlegel 1979; Bernhard *et al.* 1997). Studien zum lithoautotrophen Wachstum zeigen, dass die Deletion der MBH-Strukturgene die Verdopplungszeit nicht beeinträchtigt, wohingegen ein Fehlen der SH das Wachstum signifikant erniedrigt, da durch reversen Elektronentransport über Komplex I erst wieder NADH für die Kohlenstofffixierung gebildet werden muss (Kömen *et al.* 1992).

Die regulatorische Hydrogenase (RH) gehört zur Gruppe 2 und reguliert durch ein Zwei-Komponenten-System, das aus der Histidinkinase HoxJ und dem Responseregulator HoxA besteht die  $H_2$ -abhängige Transkription der SH- bzw. MBH-Gene (Lenz und Friedrich 1998; Lenz *et al.* 2002; Buhrke *et al.* 2004). Zusätzlich zu HoxA wird die SH- und MBH-Expression durch den alternativen Sigmafaktor  $\delta_{54}$  kontrolliert (Schwartz *et al.* 1998; Schwartz *et al.* 1999). Infolge eines Aminosäureaustausches (G422S) in HoxJ ist die Expression der Hydrogenasegene im Wildtypstamm *R. eutropha* H16 allerdings nicht mehr  $H_2$  abhängig, sondern wird nur durch eine globale Katabolit-Kontrolle reguliert (Lenz und Friedrich 1998). Durch bevorzugte Kohlenstoffquellen wie Pyruvat, Succinat oder Fruktose wird die Hydrogenase-Genexpression reprimiert und durch schlechter verwertbaren Substrate wie z. B. Glycerin dereprimiert (Friedrich *et al.* 1981). Zu der Gruppe 5 gehört ein Enzym, vornehmlich in Actinomyceten zu finden ist und daher Actinomyceten-Hydrogenase (AH) genannt wird. Dieses Enzym wurde vor kurzem als vierte Hydrogenase in *R. eutropha* nachgewiesen (Caspar Schäfer, unveröffentlichte Ergebnisse).



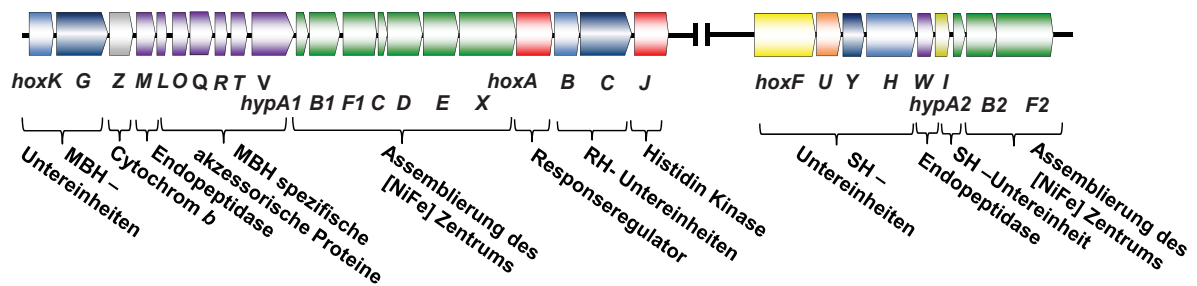


Abb. 4: Schematische Darstellung des MBH- und des SH- Operons von *Ralstonia eutropha* H16 (Pohlmann et al. 2006).

Die Biosynthese der [NiFe]-Hydrogenasen von *R. eutropha* ist ein mehrstufiger Prozess, einschließlich Kofaktor-Einbau, Untereinheiten-Assemblierung und im Falle der MBH die Tat-abhängige Translokation durch die Membran (Übersichten in: Burgdorf *et al.* 2005; Böck *et al.* 2006; Leach und Zamble 2007; Lenz *et al.* 2010). Kodiert werden die vier Hydrogenasen in drei großen Operons auf dem Megaplasmid pHG1 (siehe Abbildung 4; Schwartz *et al.* 2003). Das MBH-Operon von *R. eutropha* enthält 21 Gene, die die Strukturproteine HoxKGZ, die MBH-spezifischen akzessorischen Proteine HoxMLOQRTV, die Hyp-Proteine HypABFCDEX, verantwortlich für die Assemblierung des [NiFe]-Zentrums, und die Strukturgene HoxBC der RH sowie die regulatorischen Proteine HoxAJ codieren (Bernhard *et al.* 1996; Pohlmann *et al.* 2006; Fritsch *et al.* 2011). Die Gene für die SH-Strukturproteine HoxFUHYI, der SH-spezifischen Endopeptidase HoxW und die duplizierten Maturationsproteine HypA2B2F2 liegen in einer separaten Transkriptionseinheit. Zwischen dem SH- und MBH-Operon liegt das AH-Operon mit den Strukturgenen *hyd4SL*, den Genen für die Maturationsproteine und dem putativen Proteasegen PHG070, deren Expression, Aktivität, physiologische Rolle und Struktur Gegenstand gegenwärtiger Forschungen sind.

### 1.6 Zusammenbau des [NiFe]-Zentrums

Die Kofaktor-Synthese des [NiFe]-Zentrums und dessen Einbau in das Apoprotein wird durch mindestens sechs Maturationsproteine katalysiert. Der CN<sup>-</sup>-Ligand wird in einem ATP-abhängigen Schritt aus Carbamylphosphat durch HypF synthetisiert. Die Carbamylgruppe wird auf die Thiolgruppe des C-Terminalen Cysteins in HypE übertragen und anschließend dehydriert. Dieses führt zu einem HypE-Thiocyanat. Daraufhin wird die Cyanogruppe auf den eisenhaltigen HypCD-Komplex übertragen (Reissmann *et al.* 2003; Blokesch *et al.* 2004; Blokesch *et al.* 2004; Jones *et al.* 2004; Böck *et al.* 2006; Rangarajan *et al.* 2008; Petkun *et al.* 2011). Die Quelle des Eisenatoms ist bislang unbekannt. Der CO-Ligand wird unter anaeroben Bedingungen vermutlich durch eine Vielzahl von metabolischen Wegen gebildet,

unter aeroben Bedingungen wird er durch HypX synthetisiert und bindet anschließend an dem Eisen in dem Maturationskomplex HypCD (Ingmar Bürstel, persönliche Mitteilung). Schließlich wird der  $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Komplex in die metallfreie große Untereinheit übertragen, gefolgt von einem Einbau von Nickel durch HypA und die GTPase HypB (Olson *et al.* 2001; Blokesch und Böck 2002). Die *hyp*-Gene *hypA2*, *hypB2* und *hypF2* kommen dupliziert im SH-Gencluster vor und können Deletionen ihrer homologen Gegenstücke im MBH-Operon komplementieren (Wolf *et al.* 1998). Nach Einfügen des [NiFe]-Zentrums wird der C-Terminus der großen Untereinheit durch die spezifische Endopeptidase mit „Proofreading“-Funktion entfernt (Bernhard *et al.* 1996; Maier und Böck 1996; Thiemermann *et al.* 1996). Schließlich kommt es zur Oligomerisierung der maturen großen Untereinheit mit der kleinen Hydrogenase-Untereinheit.

### **1.7 Sauerstofftoleranz der *R. eutropha* Hydrogenasen**

Als Folge der Eigenschaft von *R. eutropha* lithoautotroph mit Wasserstoff und Sauerstoff zu wachsen, sind alle vier bislang charakterisierten Hydrogenasen aus diesem Organismus in der Lage, Wasserstoff in der Gegenwart von Sauerstoff umzusetzen (Schneider und Schlegel 1976; Buhrke *et al.* 2005; Vincent *et al.* 2005; Burgdorf *et al.* 2005; Vincent *et al.* 2005). Aufgrund ihrer Sauerstofftoleranz sind sie somit für biotechnologische Anwendungen außerordentlich interessant. Im Falle der SH wurde ein modifiziertes aktives Zentrum mit zwei zusätzlichen Cyaniden vorgeschlagen, die u. a. aufgrund sterischer Abschirmung eine Rolle bei der Sauerstoff-Toleranz spielen sollten. (Happe *et al.* 2000; Bleijlevens *et al.* 2004; van der Linden *et al.* 2004). Für die RH wurde ein verengter Gaskanal berichtet, der den Zugang von Sauerstoff zum aktiven Zentrum einschränkt (Buhrke *et al.* 2005). In der MBH, wurde vor kurzem ein ungewöhnlicher proximaler [Fe-S]-Cluster beschrieben, der eine Rolle in der Sauerstofftoleranz spielt, indem er der Elektronen zur Reduktion von Sauerstoff zur Verfügung stellen kann (Goris *et al.* 2011). Die Kristallstruktur der MBH und der verwandten sauerstofftoleranten Hydrogenasen aus *Hydrogenovibrio marinus* und *Escherichia coli* zeigen, dass der proximale Cluster durch zwei zusätzliche Cysteine koordiniert vorliegt und einen außergewöhnlichen [4Fe3S]-Cluster darstellt (Fritsch *et al.* 2011; Shomura *et al.* 2011; Volbeda *et al.* 2012).

Das [NiFe]-Zentrum der sauerstofftoleranten MBHs ist dagegen sehr ähnlich zu den  $\text{O}_2$ -sensitiven [NiFe]-Hydrogenasen, wie bereits spektroskopische Untersuchungen zeigten (Saggu *et al.* 2009; Saggu *et al.* 2010). Zusätzlich weist die Röntgenstrukturanalyse der *R. eutropha* MBH ein Netzwerk von Wasserkavitäten auf, die als ein Kanal für das Entfernen von reduzierten Sauerstoff-Spezies von dem [NiFe]-Zentrum dienen könnten (Fritsch *et al.*

2011). Wasserproduktion wurde zuvor bereits für die Reaktivierung der „Standard“-Hydrogenasen in ihrem oxidierten  $\text{Ni}_I$ -B- und  $\text{Ni}_II$ -A-Zuständen postuliert (Jones *et al.* 2003; Stein und Lubitz 2004). Für die sauerstofftoleranten Hydrogenasen wurde eine kontinuierliche Bildung von Wasser als Folge der Reaktion des aktiven Zentrums mit  $\text{O}_2$  während der  $\text{H}_2$ -Oxidation vorgeschlagen. Dem aktuellen Modell entsprechend wird zunächst ein Sauerstoffatom aus  $\text{O}_2$  direkt zu Wasser reduziert und das zweite Sauerstoffatom zunächst als verbrückener Hydroxyligand zwischen Nickel und Eisen ( $\text{Ni}_I$ -B-Zustand) gelagert werden. Der Hydroxyligand wird schlussendlich durch Protonierung als zweites Wassermolekül freigesetzt wird. (Cracknell *et al.* 2009; Lenz *et al.* 2010; Goris *et al.* 2011). Allerdings steht die experimentelle Verifizierung noch aus.

### 1.8 Die $\text{NAD}^+$ -reduzierende Hydrogenase aus *R. eutropha*

Die Sauerstofftoleranz macht die SH zu einem vielversprechenden Biokatalysator für zukünftige biotechnologische Anwendungen. Eine Konzentration von 20 % Sauerstoff (v/v) inhibiert die wasserstoffabhängige  $\text{NAD}^+$ -Reduktion kaum merklich, sogar eine Konzentration von 60 % (v/v) Sauerstoff inhibiert die Aktivität nur um 20 % (Schneider und Schlegel 1981). Dagegen wird die Aktivität von Standardhydrogenasen, z. B. der aus *Allochromatium vinosum*, vollständig durch Sauerstoff inaktiviert (Vincent *et al.* 2005).

Die SH ist als erste bidirektionale NiFe-Hydrogenase bereits 1976 von Schneider und Schlegel im Detail charakterisiert worden. Inzwischen repräsentiert die SH die als am besten untersuchte bidirektionale Hydrogenase und wird als etabliertes Modellsystem für diese Enzymklasse angesehen, wie bereits über 50 Publikationen über dieses Enzym bezeugen.

Das aus den Strukturproteinen HoxFUHYI<sub>2</sub> bestehende SH-Holoenzym katalysiert die wasserstoffabhängige  $\text{NAD}^+$ -Reduktion zu NADH. Bislang konnte keine  $\text{NADP}^+$ -Reduktion festgestellt werden (Schneider und Schlegel 1976; Burgdorf *et al.* 2005). In kinetischen Untersuchungen weist die „as isolated“-SH eine Reaktivierungsphase („lag-Phase“) auf. Es wird angenommen, dass sich ein Anteil der gereinigten SH noch im aktiven Zustand befindet und  $\text{NAD}^+$  zu NADH reduziert, das wiederum inaktive SH durch reversen Elektronentransport reaktiviert (Schneider und Schlegel 1976; Keefe *et al.* 1995). Burgdorf *et al.* postulierten, dass das Homodimer HoxI<sub>2</sub> hauptsächlich an HoxFU assoziiert vorliegt und eine NADPH-Bindungsstelle für die Reaktivierung bildet. Beim Fehlen dieser Untereinheiten soll die gereinigte SH nur durch NADH reaktiviert werden können (Burgdorf *et al.* 2005). Wie andere bidirektionale Hydrogenasen besteht die SH aus zwei unabhängigen katalytischen Einheiten, dem heterodimeren Hydrogenase-Modul (Untereinheiten HoxH und HoxY) und dem Diaphorase(NADH:Akzeptor-Oxidoreduktase)-Modul, das aus HoxF und HoxU

besteht und Ähnlichkeiten zu Untereinheiten aus Komplex I, Formiatdehydrogenasen und [FeFe]-Hydrogenasen aufweist. Eine Strategie der Evolution ist offensichtlich die wiederholte Anwendung von konservierten Protein-Domänen oder sogar ganzer Module in unterschiedlichen Enzymen, um zuvor nicht miteinander verknüpfte katalytische Funktionen zu verbinden. Im Gegensatz zu der *Rhodococcus opacus* SH, die *in vitro* leicht in der Abwesenheit von zweiwertigen Metallionen ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) und durch Verringerung der Ionenstärke des Puffers in die zwei verschiedenen Module dissoziiert, ist die heterotetramere Struktur der *R. eutropha* SH stabil (Johannssen *et al.* 1991). Nur HoxI dissoziiert von der heterotetrameren HoxFUHY unter höherer Ionenstärke und leicht alkalischen pH-Werten (Burgdorf *et al.* 2005). Für die Hydrogenase- und Diaphorase-Module aus *R. eutropha* konnte gezeigt werden, dass die getrennte Expression beider Subkomplexe und anschließende Mischung der löslichen Extrakte die katalytische Funktion des Holoenzym rekonstituiert (Massanz *et al.* 1998). Die SH ist durch die NAD(H)-Bindestelle im Diaphorase-Modul direkt mit dem cytoplasmatischen  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -Pool gekoppelt, während membrangebundene-[NiFe]-Hydrogenasen mit dem Chinon-Pool der Atmungskette gekoppelt sind. Zusätzlich zu NAD(H) kann die SH mit einer Reihe von artifiziellen und natürlichen Elektronenakzeptoren und -donoren reagieren, wie z. B. Methylviologen (MV), Benzylviologen (BV), Ferricyanid (FCN), Methylenblau, Phenazinmethosulfat (PMS), Flaoomononukleotid (FMN), Cytochrom *c* oder sogar mit Sauerstoff (Schneider und Schlegel 1976). Dies ermöglicht es, SH-Teilreaktionen, wie z. B. die Wasserstoffproduktion durch reduziertes MV durch das Hydrogenase-Modul oder NADH-abhängige Benzylviologen-Reduktion durch das Diaphorase-Modul zu untersuchen.

### 1.9 Kofaktoren der SH

In der nativen SH wird das katalytische [NiFe]-Zentrum des Hydrogenase-Moduls durch eine Serie von Eisen-Schwefel-Clustern und Flavinen mit der  $\text{NAD}^+$ -Bindungsstelle von HoxF verbunden (Abbildung 2; Burgdorf *et al.* 2005). Das Flavinmononukleotid kann dabei insgesamt drei Redoxzustände einnehmen. Durch Ein-Elektronenübertragung entstehen aus dem oxidierten FMN zwei verschiedene Semichinon-Radikal-Formen, die sich in der Ladung unterscheiden. Eine weitere Elektronenübertragung führt zum vollständig reduzierten FMN (Massey und Palmer 1966). Im Gegensatz dazu können Standard-[FeS]-Cluster nur zwei Redoxzustände unter physiologischen Bedingungen einnehmen. Die FMN-Bestimmungen der SH ergaben weniger als zwei Flavine pro SH-Molekül (Schneider und Schlegel 1978). Es ist anzumerken, dass durch die kolorimetrische Proteinbestimmung eine zu hohe Proteinkonzentration der SH bestimmt wurde, die für eine genaue Kofaktorquantifizierung

notwendig ist. (Albracht *et al.* 2003). Im Zusammenhang mit Rekonstitutionsexperimenten ist von zwei Flavinmononukleotiden in der SH ausgegangen worden (Schneider und Schlegel 1978; van der Linden *et al.* 2004). Basierend auf einer Sequenzähnlichkeit mit der Nqo1-Untereinheit von Komplex I und spektroskopischen Untersuchungen des Diaphorase-Moduls aus *R. opacus*, ist einer der Flavinkofaktoren, hier als FMN-b bezeichnet, ein Bestandteil der HoxF-Untereinheit (Schneider und Schlegel 1978; Albracht und Hedderich 2000). Dabei fungiert FMN als Kommunikator zwischen Ein-Elektronen-Zentren (Fe-S-Cluster) und Zwei-Elektronen-Zentren (NADH) in Komplex I, was auf eine analoge Rolle in der SH hindeutet. Der Bindungsort des zweiten Flavins, hier als FMN-a bezeichnet, wurde innerhalb von HoxY postuliert (van der Linden *et al.* 2004). Diese Zuordnung basiert darauf, dass die N-terminale Region von HoxY ähnlich zu dem FMN-bindenden Motiv von Flavodoxin ist. Jedoch überlappt diese räumlich mit der Bindestelle des proximalen Clusters (Volbeda *et al.* 1995). Daher wurde anfangs entweder von einem FMN oder einem [4Fe4S]-Cluster in HoxY ausgegangen. Van der Linden und Mitarbeiter postulierten, dass das FMN-a nur lose gebunden ist und leicht durch Reduktion mit NADH freigesetzt werden kann (van der Linden *et al.* 2004). Als Funktion des FMN-a wurde eine Übertragung eines Hydrids während der Wasserstoffspaltung auf das proximale [4Fe4S]-Cluster angenommen (siehe weiter unten). Zweifel kamen jedoch auf, da in dem analogen Hydrogenase-Modul von *R. opacus* kein FMN festgestellt werden konnte (Schneider *et al.* 1984). Die Fähigkeit des FMN, Ein-Elektronen-Übertragungen zu ermöglichen, hat den Nachteil, womöglich reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu produzieren, die zu Zellschädigungen führen können. Signifikante ROS-Produktion wurden sowohl für Komplex I, als auch für die SH beobachtet (Schneider und Schlegel 1981; Kussmaul und Hirst 2006).

Durch Sequenzanalyse mit Komplex I und verwandten, bereits untersuchten bidirektionalen Hydrogenasen wurde das Vorhandensein von fünf [Fe-S]-Clustern für die SH vorhergesagt (Pilkington *et al.* 1991; Albracht *et al.* 1997; Albracht und Hedderich 2000). Ein [2Fe2Fe]-Cluster und mindestens ein [4Fe4S]-Cluster wurden im SH-Holoenzym durch EPR-Spektroskopie detektiert (Schneider *et al.* 1979; Erkens *et al.* 1996; Burgdorf *et al.* 2005). Das in cyanobakteriellen bidirektionalen Hydrogenasen vorkommende Bindemotiv für einen zusätzlichen [2Fe-2S]-Cluster in HoxF ist in der SH nicht konserviert. Außerdem fehlt die HoxE-Untereinheit mit dem [2Fe2S]-Cluster in der SH. Im Falle von Komplex I wurde postuliert, dass der [2Fe-2S]-Cluster N1a in Nqo2, der außerhalb der Haupt-Elektronen-Transfer-Kette liegt, die Produktion von ROS durch die Annahme von Elektronen aus dem reduzierten Flavin erniedrigt (Hinchliffe und Sazanov 2005; Esterhazy *et al.* 2008). Für das



Hydrogenase-Modul wurde in der HoxY Untereinheit aufgrund konservierter Cysteine mit der Nqo6 Untereinheit von Komplex I und anderer bidirektionaler Hydrogenasen ein einzelner proximaler [4Fe4S]-Cluster angenommen (Pilkington *et al.* 1991; Albracht *et al.* 1997; Albracht und Hedderich 2000; Sazanov und Hinchliffe 2006). EPR-, UV-Vis- und Mößbauer-Studien zeigten in dem isolierten Hydrogenase-Modul der SH-ähnlichen Hydrogenasen aus *R. opacus* und *A. vinosum* einen [4Fe4S]-Cluster (Schneider *et al.* 1984; Zaborosch *et al.* 1995; Long *et al.* 2007). Durch das Fehlen des medialen [3Fe-4S]- und des distalen [4Fe-4S]-Clusters im C-terminalen verkürzten HoxY im Vergleich zu Standard-[NiFe]-Hydrogenasen, wird die elektronische Kopplung zu dem Diaphorase-Modul vermutlich durch den proximalen [4Fe4S]-Cluster erreicht. Für das [NiFe]-Zentrum der SH wurde ein modifiziertes Zentrum im Vergleich zu anderen [NiFe]-Hydrogenasen angenommen. Das IR-Spektrum der gereinigten, oxidierten SH zeigte vier anstatt zwei CN<sup>-</sup> Absorptionsbanden sowie eine CO-Bande (Happe *et al.* 2000). Basierend auf dieser Beobachtung und begleitenden chemischen Analysen wurde für beide Metallionen des aktiven Zentrums die Koordination je eines zusätzlichen Cyanids vermutet, die das aktive Zentrum sterisch vor Sauerstoff abschirmen sollten (van der Linden *et al.* 2004). Ferner wurde postuliert, dass das Nickel-gebundene Cyanid, das der 2098 cm<sup>-1</sup> Bande zugeordnet wurde, von HypX gebildet wird und insbesondere für die Sauerstofftoleranz der SH wichtig sei, indem es die Bildung von Ni<sub>u</sub>-A verhindert (Bleijlevens *et al.* 2004). Während der Reduktion des [NiFe]-Zentrums sollte sich nur diese 2098 cm<sup>-1</sup> Bande zu geringeren Wellenzahlen, zu 2090 cm<sup>-1</sup> und 2051 cm<sup>-1</sup>, verschieben. Unter allen getesteten Bedingungen war das [NiFe]-Zentrum EPR-inaktiv, deshalb wurde von einem Ni<sup>II</sup> in allen Redoxzuständen ausgegangen (Happe *et al.* 2000; van der Linden *et al.* 2006). Basierend auf Röntgenabsorptionsspektroskopie (X-ray absorption spectroscopy, XAS)-Studien wurde vorgeschlagen, dass Nickel sechsfach koordiniert vorliegt und harte Liganden wie C, O, oder N, besonders im vollständig oxidierten Zustand besitzt (Gu *et al.* 1996; Müller *et al.* 1997; Burgdorf *et al.* 2005; Löscher *et al.* 2005). Diese Beobachtung wurde als Sulfoxxygenierung der terminalen Nickel-gebundenen Cysteine-Thiole interpretiert, wobei Sauerstoff direkt an Nickel wie auch eine weitere Sauerstoffspezies (OOH<sup>-</sup>) an Nickel binden sollte (Burgdorf *et al.* 2005; van der Linden *et al.* 2006). Zusammenfassend wurde ein (CN)(CysSO)<sub>2</sub>(OOH)Ni(μ-CysS)<sub>2</sub>Fe(CN)<sub>3</sub>(CO)-Zentrum im oxidierten Zustand vorgeschlagen. Als Reaktionsmechanismus wurde angenommen, dass der Peroxid-Ligand am Nickel im oxidierten Zustand mit drei Elektronen reduziert und dann als Wasser freigesetzt wird, während die Wasserstoffspaltung nur an dem Nickel stattfindet, da das Eisen bereits sechsfach koordiniert ist. Des Weiteren wurde ein Hydrid-Transfer von einem Ni<sup>II</sup>-Hydrid-

Intermediat zu FMN-a mit anschließender Oxidation des reduzierten FMN-a und Weiterleitung der freigesetzten Elektronen an die [FeS]-Cluster postuliert (van der Linden *et al.* 2004).

Kontroverse Resultate wurden sowohl aus EPR- als auch FTIR-spektroskopischen Studien erhalten, wie unter anderem das Auftreten von Ni<sub>a</sub>-C- und Ni<sub>a</sub>-SR-Zuständen, die im Widerspruch zu diesem Modell standen (Erkens *et al.* 1996; Burgdorf *et al.* 2005; van der Linden *et al.* 2006). Es wurde angenommen, dass diese Redoxzustände, die in anaeroben „Standard“-[NiFe]-Hydrogenasen zu beobachten sind, einen veränderten Zustand des Enzyms darstellen und nicht am Katalysezyklus der SH beteiligt sind (Burgdorf *et al.* 2005; van der Linden *et al.* 2006).

### 1.10 Biotechnologische Anwendung von Hydrogenasen

Aufgrund der außergewöhnlichen Sauerstofftoleranz stellt die NAD<sup>+</sup>-reduzierende Hydrogenase ein vielversprechendes Enzym in der biotechnologischen Anwendung dar. Kofaktoren, wie NAD(H) werden auch von vielen industriell genutzten Redoxenzymen benötigt, wie z. B. von Dehydrogenasen und Oxygenasen. Während der Synthese dient die reduzierte Form NADH als Überträger eines Hydrids (H<sup>-</sup>), wobei oxidiertes NAD<sup>+</sup> entsteht. Um das NAD<sup>+</sup> wieder zu reduzieren, wird daher ein effektives und beständiges Regenerationssystem benötigt, um die stöchiometrische Zugabe dieses teuren Reduktionsmittels zu vermeiden. Die Verwendung einer Hydrogenase in einem solchen Regenerationssystem bietet den Vorteil, dass Wasserstoff als preiswertes Reduktionsmittel eingesetzt werden kann und keine weiteren Nebenprodukte außer Protonen entstehen (Klibanov und Puglisi 1980; Ratzka *et al.* 2012). Des Weiteren wurde bereits der Einsatz von Hydrogenasen als Wasserstoffsensor (Abbildung 32F) und in biologischen Brennstoffzellen gezeigt (Lutz *et al.* 2005; Vincent *et al.* 2006). Momentan wird H<sub>2</sub> fast ausschließlich durch Elektrolyse von Wasser mittels Platinkatalysatoren oder aus fossilen Energiequellen, wie beispielsweise Erdgas, gewonnen. Eine lichtgetriebene biologische Wasserstoffproduktion aus Kopplung des wasserspaltenden Photosystems II mit H<sub>2</sub>-produzierenden Hydrogenasen in Cyanobakterien würde eine nachhaltige Produktion von H<sub>2</sub> nur aus Wasser und Sonnenlicht erlauben (Krassen *et al.* 2009). Daher herrscht großes Interesse an der Aufklärung der Funktionsweise von Hydrogenasen, um sie in der biotechnologischen Produktion und Nutzung von H<sub>2</sub> einzusetzen.

### 1.11 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die O<sub>2</sub>-Toleranz der SH aus *R. eutropha* H16 aufzuklären sowie verschiedene H<sub>2</sub>-abhängige Kofaktorregenerationssysteme zu etablieren. Das Modell der Sauerstofftoleranz der SH mit vier CN-Liganden am [NiFe]-Zentrum war stark umstritten (Erkens *et al.* 1996; van der Linden *et al.* 2006). Daher sollte die SH in ihrer natürlichen Umgebung, als Bestandteil des Cytoplasmas, mit einem kombinierten EPR- und FTIR-Spektroskopie-Ansatz in ganzen Zellen untersucht werden. Anschließend wurde die Produktion und Reinigung der SH optimiert, um hochaktives homogenes Protein mit unterschiedlichen spektroskopischen Methoden wie UV-Vis- und Infrarotspektroskopie zu untersuchen und ausreichende Mengen für den Einsatz in der *in vitro*-Kofaktorregeneration zu erhalten. Aufgrund der hohen Komplexität der SH in Bezug auf die Untereinheiten- und Kofaktoren-Zusammensetzung, sollten die katalytische Module unabhängig voneinander untersucht werden, um den Reaktionsmechanismus der SH in überschaubaren Teilreaktionen zu betrachten. Dafür wurden Produktionssysteme für das Diaphorase- und Hydrogenase-Modul benutzt, die bereits zuvor zur Aufklärung der Assoziation des HoxI Homodimer am Diaphorase-Modul bzw. als Kontrolle der Hydrogenasefusionsproteine mit dem Photosystem I eingesetzt wurden (Burgdorf *et al.* 2005; Doktorarbeit Alexander Schwarze).

Ein umfangreiche Charakterisierung beider Module in Bezug auf Kofaktoren, Redoxeigenschaften und der Sauerstofftoleranz wurde im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt.

Um ein neues Modell zur Sauerstofftoleranz der SH aufzustellen, wurden die Reaktionen mit Sauerstoff und deren Produkte näher untersucht. Dafür wurde eine neue massenspektroskopische Detektionsmethode von Wasser, das durch isotopisch markiertes <sup>18</sup>O<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> durch die SH produziert wurde, etabliert.

Aufgrund der Sauerstofftoleranz stellt die SH ein vielversprechendes Kofaktorregenerationssystem für NADH dar. Da die SH jedoch nur NAD<sup>+</sup> reduzieren kann, sollte die NAD<sup>+</sup>-Bindungsstelle zu einer NADP<sup>+</sup>-Bindungsstelle umgewandelt werden. Des Weiteren sollte die SH in *P. putida* heterolog produziert werden, so dass dieses System zukünftig für eine wasserstoffabhängige *in vivo*-Kofaktorregenerierung eingesetzt werden kann.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Bakterienstämme und Plasmide

Bakterienstämme und Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 1 aufgeführt. *E. coli* DH10 $\beta$  wurde standardmäßig für Klonierungen genutzt und *E. coli* S17-1 als Donor für konjugativen Plasmidtransfer. *R. eutropha* H16 ist der Wildtypstamm. Derivate des Stammes sind durch die Buchstaben HF gekennzeichnet. Die pCH-Plasmide besitzen ausschließlich einen "ColE1-Origin" und werden demzufolge nur in *E. coli*-Verwandten repliziert. Die pGE-Plasmide sind Weit-Wirts-Bereich-Plasmide und sowohl in *E. coli* als auch in Nicht-Enterobakterien (z. B. *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas putida*) vermehrungsfähig. Sie gehören zur IncP-Inkompatibilitätsgruppe.

**Tabelle 1: Verwendete Stämme und Plasmide.**

Stämme/ Plasmide	Relevante Eigenschaften	Herkunft/ Referenz
<b><i>E. coli</i></b>		
DH10 $\beta$	<i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>fhuA lacX74 galK</i> ( $\phi$ 80 $\Delta$ ( <i>lacZ</i> )M15) <i>mcrA galU recA1 endA1 nupG rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> )	(Grant <i>et al.</i> 1990)
S17-1	Tra <sup>+</sup> <i>recA</i> pro <sup>-</sup> th <sup>-</sup> , <i>hsdR</i> chr:RP4-2	(Simon <i>et al.</i> 1983)
<b><i>R. eutropha</i></b>		
H16	Wildtyp mit Megaplasmid pHG1, SH <sup>+</sup> RH <sup>+</sup> MBH <sup>+</sup> HoxJ <sup>-</sup>	DSM 428, ATCC 17699 (Wilde 1962)
HF210	Megaplasmidfrei (SH <sup>-</sup> MBH <sup>-</sup> RH <sup>-</sup> )	(Kortlücke und Friedrich 1992)
HF500	$\Delta$ <i>hoxG</i> $\Delta$ <i>hoxC</i> $\Delta$ <i>hoxH</i> (SH <sup>-</sup> MBH <sup>-</sup> RH <sup>-</sup> )	(Kleihues <i>et al.</i> 2000)
HF788	Überproduktion von HoxHY (HoxY- <i>Strep-tag</i> II) $\Delta$ <i>hoxFU</i>	(Schwarze 2011)
HF798	Derivat von HF500, $\Delta$ <i>hoxG</i> $\Delta$ <i>hoxC</i> (SH <sup>+</sup> RH <sup>-</sup> MBH <sup>-</sup> )	Diese Arbeit
HF903	Derivat von HF798, $\Delta$ <i>hoxFU</i> durch Rekombination mit pCH1462 (SH <sup>-</sup> RH <sup>-</sup> MBH <sup>-</sup> )	Diese Arbeit
HF424	SH <sup>-</sup> MBH <sup>-</sup> , $\Delta$ <i>hoxFUYHW</i> $\Delta$ <i>hoxG</i>	(Massanz <i>et al.</i> 1998)
<b><i>P. putida</i></b>		
KT2440	<i>hsdR1</i> , <i>hsdM</i> <sup>+</sup> , Ben <sup>+</sup>	DSM6125 (Bagdasarian <i>et al.</i> 1981)
<b>Plasmide</b>		
Litmus 28	Apr <i>lacZ'</i> ColE1 <i>ori</i>	New England Biolabs
pLO1	Km <sup>r</sup> , <i>sacB</i> , RP4 <i>oriT</i> , ColE1 <i>ori</i>	(Lenz <i>et al.</i> 1994)
pBlueskript t II KS+	P <sub>T7</sub> , P <sub>T3</sub> , P <sub>lac</sub> , <i>lacZ'</i> , Amp <sup>r</sup> , ColE1 <i>ori</i>	Stratagene Cloning Systems
pCM62	Weitwirtsbereich-Plasmid, Tc <sup>R</sup> Mob <sup>+</sup>	(Marx und Lidstrom 2001)

---

pHD	Plasmid aus HF788, Hydrogenase-Modul-Expressionsplasmid	(Schwarze 2011)
	<i>hoxFUYWIhypA2B2F2CDEXhoxABCJ</i> (Strep- tag II an HoxY)	
pEDY309	Weitwirtsbereich-PlasmidTc <sup>r</sup> RK2 <i>ori Mob</i> <sup>+</sup>	(Kleihues <i>et al.</i> 2000)
pTBu1085	<i>hoxFUH</i>	Tanja Burgdorf
pCH1462	$\Delta$ <i>hoxFU</i> in pLO1	(Schwarze 2011)
pCH1613	4,08 kbp-EcoRI-Fragment religiert pTBU1058; <i>Strep</i> -tag II an HoxF	Diese Arbeit
pCH1614	pSPZ10 898 bp XhoI/HindIII-PCR-Produkt in 3,8 kbp-XhoI/HindIII-Fragment aus pCH1613; <i>PalkB-hoxF</i> <sup>+</sup>	Josta Hamann
pCH1615	3,4 kb BamHI/HindIII pJH3180 in Litmus 28	Diese Arbeit
pJH3180	1,8 kb EcoRV/HindII pCH1614+4,46 EcoRV/HindIII pTBu1085	Diese Arbeit
pJH3203	3,4 kb BamHI/HindII pJH3180,8kb BamHI/HindII Litmus28	Diese Arbeit
pCH1616	3kb XbaI/SapI-Fragment aus pJH3203 in 12,5kb XbaI/SapI-Fragment aus pJH2904	Diese Arbeit
pLL1	15,5 kb-SpeI/XbaI-Fragment aus pJH1616 in 6,9kb-SpeI/XbaI-Fragment aus pCM62	Diese Arbeit
pJH3001	<i>hoxFUYWIhypA2B2F2CDEXhoxA</i> in pEDY309	Oliver Lenz
pJH2904	14,9 kb-HindIII aus pGE770 in Litmus 28	Diese Arbeit
pCH1500	Derivat von pCH472: <i>hoxH</i> in pLO1	Diese Arbeit
pCH472	<i>hoxH</i> in pBluescript KS <sup>+</sup>	(Massanz <i>et al.</i> 1997)
pCH1596	15,3-bp-HindIII Fragment aus pGE770 + 3,557kb-HindIII-Fragment aus pCH1597	Diese Arbeit
pCH1597	1,6 kb-SpeI/EcoRI-Fragment aus pCH646 in 2,8kb-SpeI/EcoRI-Fragment aus Litmus28	Diese Arbeit
pCH1580	HoxH <sup>I64A</sup> Derivat von pCH1596 mit 5,27 kb FseI-PspMOI-Fragment von pGE475	Diese Arbeit
pCH644	$\Delta$ <i>hoxC</i> in pLO1	(Lenz und Friedrich 1998)
pCH646	<i>hoxA</i> in pBlueKS <sup>+</sup>	Oliver Lenz
pCH1575	Derivat von pCH1582; HoxF <sup>D400K</sup> ; Quik Change	Diese Arbeit
pCH1576	Derivat von pCH1582; HoxF <sup>D467S</sup> ; Quik Change	Diese Arbeit
pCH1578	Derivat von pCH1575; HoxF <sup>D400K</sup> ; 2,1 kb-XbaI-PspMOI-Fragment aus pCH1575+ 17 kb XbaI-PspMOI-Fragment aus pCH1581	Diese Arbeit
pCH1579	Derivat von pCH1576; HoxF <sup>D467S</sup> ; 2,1 kb-XbaI-PspMOI-Fragment aus pCH1576 in 17kb XbaI-PspMOI-Fragment aus pCH1581	Diese Arbeit
pCH1581	Derivat von pGE750; (HoxY <i>Strep</i> -tag II); 2,8 kB SpeI-XbaI-Fragment aus Litmus28 + 16kb-SpeI-XbaI-Fragment aus pGE750	Diese Arbeit
pCH1582	Derivat von pGE750; HoxF-Fragment in pBluescript KS <sup>+</sup> ; 2,1 kb-XbaI-PspMOI-Fragment aus pGE750	Diese Arbeit
pCH1599	Derivat von pCH1582; HoxF <sup>D401K D340A</sup> Quik Change	Diese Arbeit
pCH1601	Derivat von pCH1582; HoxF <sup>D401K D467S</sup> Quik Change	Diese Arbeit
pCH1602	Derivat von pCH1582; HoxF <sup>E341A D467S</sup> Quik Change	Diese Arbeit
pCH1604	Derivat von pCH1599; HoxF <sup>D401K D340A</sup> ; 2,1 kb -XbaI-PspMOI-	Diese Arbeit

	Fragment aus pCH1599+ 17 kb-XbaI-PspMOI-Fragment aus pCH1581	
pCH1606	Derivat von pCH1601; HoxF <sup>D401K D467S</sup> ; 2,1 kb-XbaI-PspMOI-Fragment aus pCH1601+ 17 kb-XbaI-PspMOI-Fragment aus pCH1581	Diese Arbeit
pCH1607	Derivat von pCH1602; HoxF <sup>E341A D467S</sup> ; 2,1 kb-XbaI-PspMOI-Fragment aus pCH1602+ 17 kb-XbaI-PspMOI-Fragment aus pCH1581	Diese Arbeit
pLL113	Derivat von pCH1582; HoxF <sup>D341A</sup> ; Quik Change	Diese Arbeit
pLL110	Derivat von pCH1582; HoxF <sup>D340A</sup> ; Quik Change	Diese Arbeit
pLL123	Derivat von pLL113; HoxF <sup>D341A</sup> ; 2,1 kb-XbaI-PspMOI-Fragment aus pCH1575+ 17 kb-XbaI-PspMOI-Fragment aus pCH1581	Diese Arbeit
pCH127	Derivat von pLL110; HoxF <sup>D340A</sup> ; 2,1 kb-XbaI-PspMOI-Fragment aus pLL110+ 17 kb-XbaI-PspMOI-Fragment aus pCH1581	Diese Arbeit
pLL143	19kb-SH Operon ( <i>Strep</i> -HoxY) $\Delta$ hoxBCJ XbaI-SpeI-Fragment aus pCH1578+ 6,8 kb-XbaI-Fragment aus pCM62 HoxF <sup>D340A</sup>	Diese Arbeit
pLL146	19kb-SH Operon( <i>Strep</i> -HoxY) $\Delta$ hoxBCJ XbaI-SpeI-Fragment aus pLL123+ 6,8 kb-XbaI-Fragment aus pCM62 HoxF <sup>D341A</sup>	Diese Arbeit
pCom10 (PspAlk)	CYP153A Monooxygenase, Ferredoxin und Ferredoxin Reduktase von <i>Polaromonas sp.</i> Stamm JS666	Bettina Nestl (AG Hauer), nicht veröffentlicht
pGE475	SH-Überproduktionsplasmid mit HoxH <sup>I64A</sup>	(Burgdorf <i>et al.</i> 2002)
pGE749	HoxH <sup>I64A</sup> 16 kb-SpeI-XbaI-Fragment von pCH1580 in 21 kb-XbaI aus pEDY309	Diese Arbeit
pGE617	<i>hoxFUYH</i> WT <i>hypA2B2F2</i> mit intergener Region am 3'-Ende von <i>hypF2</i> vor <i>hypC</i> in pCM783; <i>hypF2</i> per PCR modifiziert; SH-Überexpressionsplasmid	Tanja Burgdorf (AG Friedrich)
pGE553	Expressionssystem für <i>hoxFU</i> ( <i>Strep</i> -tag II an HoxF)	(Burgdorf <i>et al.</i> 2005)
pGE770	<i>hoxFUYWIhypA2B2F2CDEXhoxABCJ</i> ( <i>Strep</i> -tag II an HoxF) in pCM62	Tanja Burgdorf (AG Friedrich)
pGE760	SH-Überexpressionsplasmid <i>hoxFUYWIhypA2B2F2CDEXhoxA</i> ( <i>Strep</i> -tag II an HoxF)	Diese Arbeit
	16 kb SpeI/XbaI pCH1596 Fragment in pEDY309	
pGE750	SH-Überexpressionsplasmid (HoxY, <i>Strep</i> -tag II) <i>hoxFUYWIhypA2B2F2CDEXhoxA</i>	Diese Arbeit
pGE772	Derivat von pCH1604, HoxF <sup>D340A D400K</sup> 19 kb-XbaI-SpeI-Fragment aus pCH1604+ 21 kb-XbaI-Fragment aus pEDY309	Diese Arbeit
pGE761	SH Operon( <i>Strep</i> -HoxY) $\Delta$ hoxBCJ, 19 kb-XbaI-SpeI-Fragment aus pCH1578+ 21 kb-XbaI-Fragment aus pEDY309 HoxF <sup>D401K</sup>	Diese Arbeit
pGE763	19 kb SH-Operon( <i>Strep</i> -HoxY) $\Delta$ hoxBCJ XbaI-SpeI-Fragment aus pCH1579+ 21 kb XbaI-Fragment aus pEDY309 HoxF <sup>D467S</sup>	Diese Arbeit
pGE774	Derivat von pCH1606 HoxF <sup>D400K D467S</sup> 19 kb XbaI-SpeI-Fragment	Diese Arbeit

aus pCH1606 + 21 kb XbaI-Fragment aus pEDY309

pGE775 Derivat von pCH1607 HoxF<sup>E341A D467S</sup> 19 kb XbaI-SpeI-Fragment Diese Arbeit

aus pCH1607+ 21 kb XbaI-Fragment aus pEDY309

<sup>a</sup> Für Genotyp-Abkürzungen siehe Bachmann (1983) <sup>b</sup> Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

**Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide.**

Mutageneseprimer	Sequenz (5'→3')
1 ll20_sense_hoxF_D340A	CTTATATCTGCGGCGCCGAATCGGCGCTCAT
2 ll21_anti_hoxF_D340A	ATGAGCGCCGATTCGGCGCCGCAGATATAAG
3 ll22_sense_hoxF_E341A	ATCTGCGGCGACGCATCGGCGCTCATC
4 ll22_antisense_E341A	GATGAGCGCCGATGCGTCGCCGCAGAT
7 ll54_D400K	GGGCGATGGGAACGCCAAAGTCGGCCGGC
8 ll55_D400K_antisense	GCCGGCCGACTTTGGCGTTCCCATCGCCC
9 ll56_D467S	CGCAAGCTCGCGTACGAATCGCTTTCGTGCAATGGCGCC
10 ll57_D467S_antisense	GGCGCCARRGCACGAAAGCGATTCGTACGCGGAGCTTGCG
11 ll14_AA	GCTTATATCTGCGGCGCCGCCTCGGCGCTCATCGAG
12 ll15_antisense_AA	ACTCGATGAGCGCCGAGGCGGCGCCGCAGCTATAAGC
Sequenzierungsprimer	
13 ll44_antisense_sequencing	TAATACGACTCACTTAAGGC
14 M13_forward	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
15 M13_reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
16 3-9 HoxH Sac(+)	TTT GCC GAG CTC GAT CAA TC
17 4-1 HoxH Sac(-)	CCA TGC GGA GCT CCC ACT GC
18 4-2 HhaI-forward	CAC GAA GGG GCG GAC GAA
19 4-3 HhaI-reverse	ACC AGG TTG GCG AAC GTG
20 ll51_hoxF Promoter	AAGTGACGCACCAAGCAAGG
21 ll33_HoxFU_PspOMI	TCCTTCAGCGCCTTCTCATA
22 ll32_hoxU	GTGAATTCGAGCTCGGTACC
23 ll31_HoxF	TGCAGGTCGACTCTAGAACC

## 2.2 Kultivierung der Bakterien

### 2.2.1 Wachstumsmedium

*R. eutropha*-Stämme wurden in einem Mineralsalz-Medium kultiviert (Schlegel *et al.* 1961; Friedrich *et al.* 1981). Das Medium basierte auf einem Phosphat-Puffer ("H16-Puffer"), bestehend aus 25 mM Na<sub>2</sub>H(PO<sub>4</sub>) und 11 mM KH<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>) mit einem pH-Wert von 7,0. Weitere Nährstoffe wurden als Stammlösungen in Endkonzentrationen von 37,4 mM NH<sub>4</sub>Cl, 0,81 mM Mg(SO<sub>4</sub>)X 7 H<sub>2</sub>O, 0,068 mM CaCl<sub>2</sub> X 2 H<sub>2</sub>O, 18 µM FeCl<sub>3</sub> X 6 H<sub>2</sub>O, 1 µM ZnCl<sub>2</sub>, einfach

SL6 (Atlas 2004) und 1  $\mu\text{M}$   $\text{NiCl}_2$  hinzugegeben. Medien für heterotrophes Wachstum enthielten Fruktose (0,4 % w/v; FN medium), eine Mischung aus Fruktose und Glycerin (jeweils 0,2 %; FGN Medium), oder 0,05 % w/v Fructose und 0,4 % v/v Glycerin (modifiziertes FGN medium; FGN<sup>mo</sup>). Chemolithoautotrophe Kulturen wuchsen im Mineralsalz-Medium ohne C-Quelle unter einer Atmosphäre von  $\text{H}_2$ ,  $\text{O}_2$  und  $\text{CO}_2$  bei einem Verhältnis von 70, 20, 10 % v / v, wenn nicht anders angegeben.

Für *P. putida* wurde als Kohlenstoffquelle 0,2 % w/v Glukose und 0,4 % v/v Glycerin (GGN Medium) mit 36  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$  eingesetzt. Als komplexe Medien wurden Lysogeny-Broth-Medium (LB), mit 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt und 5 g/l NaCl, salzarmes Luria-Broth-Medium (LSLB) mit derselben Zusammensetzung, außer dass 2,5 g/l NaCl eingesetzt oder Nährbouillon (NB) Medium mit 8 g/l Nährbouillon verwendet wurde. Feste Komplexmedien enthielten 1,2 % w/v Agar-Agar (Roth) bzw. Minimalmedien 1,2 % w/v Reinst-Agar (Difco Bacto<sup>TM</sup> Agar). Antibiotika wurden als Stammlösungen hergestellt: 100 mg/ml Ampicillin (Natriumsalz), 100 mg/ml Kanamycin-Sulfat jeweils in entionisiertem  $\text{H}_2\text{O}$ , 10 mg/ml Tetracyclin-Hydrochlorid in 70 % v/v Ethanol. Antibiotika wurden in den folgenden Endkonzentrationen verwendet: Ampicillin 100  $\mu\text{g/ml}$  für flüssige und feste Medien, Kanamycin 50  $\mu\text{g/ml}$  für *E. coli* und *P. putida* (flüssigen und festen Medien) und 400  $\mu\text{g/ml}$  für *R. eutropha*. Tetracyclin 10  $\mu\text{g/ml}$  (flüssige Medien) und 15  $\mu\text{g/ml}$  (feste Medien) für *R. eutropha*, *P. putida* und *E. coli*.

### 2.2.2 Bestimmung der Wachstumsparameter

Das Wachstum von Bakterienkulturen wurde durch Messung der optischen Dichte mit einem Photometer (U-2000, Hitachi, Japan) bei einer Wellenlänge von 436 nm ( $\text{OD}_{436}$ ) für *R. eutropha* oder bei 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) für *E. coli* oder *P. putida* gegen Medium oder H16-Puffer bestimmt. Zellsuspensionen wurden verdünnt, so dass die gemessenen Werte unter  $\text{OD} = 0,3$  waren.

### 2.2.3 Zellkultivierung

Agarplatten wurden in der Regel bei 37 °C inkubiert. Kulturvolumen für Klonierungen und Vorkulturen wurden stets mit einer Einzelkolonie beimpft. Die Kultivierung von *R. eutropha* unter Hydrogenase-dereprimierenden Standardbedingungen erfolgte bei 30 °C in FGN in 100 ml gefüllten 500 ml-Schikanekolben. Heterotrophe Kulturen wurden unter Luftatmosphäre, lithoautotrophe Kulturen in Exsikkatoren unter definierten Gasgemischen auf einem Schüttler bei 120 rpm inkubiert. Je nach Gasverbrauch der in Exsikkatoren gewachsenen Kulturen wurde die Atmosphäre häufig ausgetauscht. Heterotrophe Kulturen

wurden nach 48 h bei einer  $OD_{436}$  von ca. 8-10 geerntet, lithoautotrophe Kulturen wurden ebenso bei einer  $OD_{436}$  zwischen 8-10 geerntet.

Die heterotrophen Kulturen von HF788 und HF424(pGE553) für Hydrogenase- bzw. Diaphorase-Modul-Produktion wurden in 10 l-Fermentern (Biostat MD; Braun) bei einer Rührergeschwindigkeit von 400 rpm und Begasung von 2 l/min Luft (21 %  $O_2$ ) inkubiert, bis die optische Dichte der Kultur bei 436 nm ( $OD_{436}$ )  $10 \pm 1$  erreichte. Schaumbildung wurde, wenn nötig, durch Zugabe von wenigen Mikrolitern Polypropylenglycol 2000 reduziert. Lithoautotrophe großtechnische Kultivierungen wurden in einem 10 l Fermenter mit einem Gasgemische von 80 %  $H_2$ , 10 %  $O_2$  und 10 %  $CO_2$  durchgeführt (Type NLF 22, Bioengineering, Wald, Switzerland).

$O_2$ -limitiertes Wachstum konnte erreicht werden, indem die Zellen in FGN<sup>mo</sup> Medium mit 400 ml bzw. 4 l Kultur in einem gefüllten 500 ml bzw. 5 l Schikanekolben unter Luft bei 120 rpm für 5-7 d (bis  $OD_{436} = 8-10$ ) bei 30 °C geschüttelt wurden.

Zur Expression von Genen unter der Kontrolle des *alkB*-Promotors wurden *P. putida* Zellen in GGN bei 30 °C kultiviert. Die Genexpression wurde in der späten Wachstumsphase ( $OD_{600}$  von etwa 4) durch Zugabe von 0,05 % Oktan oder DCPK induziert und die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Kleinere Kulturvolumen (weniger als drei ml) wurden für eine min bei 15000 Xg (Biofuge 13, Heraeus, Deutschland) zentrifugiert. Kulturen mit einem Volumen von 50 ml wurden für eine Dauer von 15 min bei 6000 x g bei 4 °C geerntet (Heraeus Megafuge1.0R, Heraeus, Deutschland).

Die Ernte größerer Kulturen erfolgte bei 4 °C für 12 min bei 6000 x g (F9S-4x1000y; Thermo Fisher). Im Falle der Diaphorase-Modul-Produktion wurden die geernteten Zellen in 50 mM Kaliumphosphatpuffer (K- $PO_4$ ) pH 7,0 mit 50 mM Succinat einmal gewaschen und erneut zentrifugiert. Zellpellets wurden während der Ernte auf Eis gehalten, das Nassgewicht der Pellets bestimmt, diese in flüssigem  $N_2$  schockgefroren (ca. -196 °C) und anschließend bei -80 °C gelagert.

Für *in situ*-FTIR/EPR-Experimente wurde das Zellpellet zweimal mit 50 mM K- $PO_4$  pH 7,0 gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in demselben Puffer resuspendiert, um eine endgültige  $OD_{436}$  von ca. 2000 (entspricht ca. 190 mg/ml Gesamtprotein) zu erhalten, und anschließend auf Eis gelagert.

#### 2.2.4 Konservierung von Bakterienstämmen

Zur Kurzzeitkonservierung wurden die Bakterienstämme auf selektiven Agarplatten bei 4 °C bis zu einem Monat gelagert. Für Langzeitkonservierung der Stämme wurden diese in LB mit dem jeweiligen Antibiotikum kultiviert (*E. coli*-Stämme), GN Medium (*P. putida*) oder FN



Medium (*R. eutropha*) und in der späten exponentiellen Phase mit Glycerin zu einer 22% (v/v) Endkonzentration versetzt und anschließend bei -80 °C eingefroren. Bei Bedarf wurde Zellmaterial zur Reaktivierung mit einer sterilen Impföse entnommen.

### 2.3 Zellfraktionierung und Proteinreinigung

Alle Schritte der Proteinreinigung wurden bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Die Anreicherung rekombinanter Proteine mit *Strep*-tag II wurde durch Affinitätschromatographie erreicht (Schmidt *et al.* 1996; Voss und Skerra 1997). Für die Reinigung des Hydrogenase- und des Diaphorase-Moduls wurden *R. eutropha*-Zellen im Resuspensionpuffer (150 mM KCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 ml pro 1 g Nassgewicht), der EDTA-freien Proteaseinhibitor-Cocktail (Roche) enthielt, resuspendiert. Die Zellen wurden durch zwei Passagen in einer 4 °C gekühlten French-Press-Zelle (SLM Aminco; USA) bei 6,2 MPa aufgebrochen und die entstandene Zellsuspension wurde bei 100000 x g für 45 min zentrifugiert. Der Überstand (löslicher Extrakt) wurde in ein 2 ml *Strep-Tactin* Superflow-Säule (IBA), mit 6 ml Resuspensionspuffer ohne Protease-Inhibitor gewaschen und mit dem gleichen Resuspensionspuffer, der 5 mM Desthiobiotin enthielt, eluiert. Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden gepoolt und durch Ultrafiltration (Amicon Diaflo Zelle YM 30-Membran; Amicon, Witten, Deutschland) konzentriert. Im Falle des Diaphorase-Moduls schloss eine Größenausschlusschromatographie (Superdex 200, Amersham Biosciences, 120 ml Bett-Volumen) der Affinitätschromatographie an. Die Größenausschlusschromatographie wurde mit Resuspensionspuffer bei einer Flussrate von 1 ml/min durchgeführt.

Die molekulare Masse der Proteinkomplexe wurde in Bezug auf die Laufeigenschaften von Standard-Proteinen mit bekannten Größen während der Größenausschlusschromatographie bestimmt. Für die Reinigung der heterohexameren SH über eine Affinitätschromatographie wurden die Zellen in Kaliumphosphatpuffer (50 mM K-PO<sub>4</sub>, 5 % Glycerin, 5 mM NAD<sup>+</sup> pH 7,0 2 ml pro 1 g Nassgewicht) mit zusätzlichen Protease-Inhibitor-Cocktail (EDTA-free Protease Inhibitor, Roche) resuspendiert, der mit Argon gesättigt war. Die Zellen wurden wie oben beschrieben aufgebrochen und der lösliche Extrakt vom Sediment getrennt. Die Suspension blieb dabei unter Argon. Der Überstand wurde auf einer 4 ml *Strep-Tactin* Superflow Säule (IBA) aufgetragen, mit zuerst 8 ml Resuspensionpuffer aerob und anschließend mit 12 ml des Resuspensionspuffer ohne NAD<sup>+</sup> gewaschen und mit demselben Puffer, der 5 mM Desthiobiotin enthielt, eluiert.

Heterotetramere SH ohne das HoxI-Homodimer konnte gereinigt werden, wenn der Phosphatpuffer (50 mM K-PO<sub>4</sub>, 5 % Glycerin, pH 7,0) mit einem Puffer höherer Ionenstärke

und leicht alkalischem pH-Wert (150 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, 5 % Glycerin pH 8.0) ersetzt wurde.

## 2.4 Probenanalytik

### 2.4.1 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem BCA<sup>TM</sup>-Kit nach Herstellerangaben (Pierce, Thermo Fisher Scientific, USA) bestimmt. Die Messung bei einer Wellenlänge von 562 nm erfolgte in 96-Vertiefungs-Mikrotiterplatten, die in einem SpectraMax 340 Plattenleser (Molecular Devices, USA) ausgelesen wurden. Als interner Standard wurden die parallel gemessenen Absorptionswerte von sieben Verdünnungen (0 bis 1000 µg/ml) einer BSA-Lösung (Pierce, Thermo Fisher Scientific oder Sigma-Aldrich, beide USA) eingesetzt.

### 2.4.2 Bestimmung der Hydrogenase-Aktivität

Die quantitative Aktivitätsbestimmung der SH beruhte auf der H<sub>2</sub>-abhängigen Reduktion von NAD<sup>+</sup> (Schneider und Schlegel 1976). Dabei entspricht 1 Unit (U) der Reduktion von 1 µmol NAD<sup>+</sup> pro Minute. Die Reduktion wurde in einem Zweistrahl-UV-Vis-Spektrophotometer des Typs Cary 300 von Varian<sup>TM</sup> bei einer Wellenlänge von 365 nm aufgezeichnet und mit dem Programm CaryWin (Varian<sup>TM</sup>) ausgewertet. Die Messung erfolgte wie bei allen anderen Aktivitätsansätzen bei 30°C in einer 3 ml Anaerobenküvette mit 2 ml H<sub>2</sub>-gesättigten 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0, der 1 µM FMN, 1 mM DTT und 1 mM NAD<sup>+</sup> enthielt. Die Reaktion wurde mit 2-50 µl Enzym gestartet und die Reduktion von NAD<sup>+</sup> bei 365 nm ( $\epsilon = 3.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) verfolgt. Bei Experimenten zur Bestimmung reduzierter Sauerstoffspezies wurde TCEP anstelle von DTT benutzt. Für die H<sub>2</sub>-abhängige NAD<sup>+</sup> Aktivitätsmessung mit Zellen wurden diese durch die Inkubation mit 0,005 % (w/v) Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), permeabilisiert (Friedrich *et al.* 1981). Für Experimente zur Sauerstofftoleranz wurden verschiedene Mischungen von 1 bar gesättigten O<sub>2</sub>-, N<sub>2</sub>- und H<sub>2</sub>-Puffern genutzt, sowie entsprechende Gasgemische im Überstand eingestellt.

Analog zur H<sub>2</sub>-abhängigen NAD<sup>+</sup> Reduktion wurde die Reduktion von 5 mM Methyviologen (MV) bei 603 nm ( $\epsilon = 13 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Watanabe und Honda 1982) in H<sub>2</sub>-gesättigtem 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) verfolgt. Experimente in Gegenwart von Sauerstoff waren mit MV aufgrund der Reoxidation durch O<sub>2</sub> von reduziertem MV nicht möglich.

Um die reduktive Aktivierung von HoxHY zu verfolgen, wurde in einem 15-µl Tropfen 120 pmol Protein, 90 nmol Dithionit (DT) mit (400 pmol) oder ohne FMN auf die Innenwand der Küvette pipettiert. Nach 30 s wurde der Tropfen mit dem Assay-Puffer gemischt und die



H<sub>2</sub>-abhängige MV-Reduktion spektrophotometrisch gemessen. Für Experimente ohne Vorinkubation, wurden 120 pmol HoxHY direkt in den 2 ml H<sub>2</sub>-gesättigten TrisHCl-Puffer (50 mM, pH 8,0), der 5 mM MV und 45 µM DT enthielt, hinzugefügt.

Die Wasserstoff-Produktion wurde bei 30 °C mit einer modifizierten Clark-Elektrode und reduziertem MV als Elektronendonator quantifiziert (Schwarze *et al.* 2010). Die Test-Kammer war dabei mit 1,3 ml N<sub>2</sub>-gesättigtem TrisHCl-Puffer (50 mM pH 8,0) gefüllt, der 7,7 mM DT und 5 mM MV enthielt. Alternativ dazu wurden 100 µl Gasproben aus einem 1 mM NADH, 1 µM FMN, 1 mM TCEP, 55 µg SH Ansatz in einem gasdichten 5,1 ml-Gefäß entnommen und mit einem Gaschromatographen (Shimadzu GC-2014AT ausgestattet für die Detektion von Gasen mit einer „HayeSep N“-Säule und einem 13X-Molekularsieb entsprechend den Spezifikationen A0608005) für Wasserstoffproduktion analysiert.

#### 2.4.3 Bestimmung der Diaphorase-Aktivität

Die Diaphorase-Aktivität wurde anaerob nach Schneider und Schlegel 1976 durch Reduktion von BV durch NADH (50 mM TrisHCl-Puffer pH 8,0, 1 mM NADH, 5 mM Benzylviologen, 90 µM DT und 10 bis 50 pmol des Enzyms) bestimmt. Die Reduktion von BV wurde spektrophotometrisch bei 578 nm ( $\epsilon = 8,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) verfolgt.

Für Kinetiken mit NADP(H) wurde das Reaktionsvolumen von 2 ml auf 200 µl erniedrigt und entsprechende 140 µl-Küvetten (Varian™) eingesetzt. Um die Affinität zum Substrat zu bestimmen ( $K_m$ -Werte), wurde die Konzentration von NAD(P)<sup>+</sup> und von NAD(P)H bei den jeweiligen Hydrogenase- und Diaphorase-Aktivitätassays variiert.

#### 2.4.4 Bestimmung der Oxidase-Aktivität

Die Sauerstoffreduktion wurde bei 30 °C mit einer Clark-Elektrode quantifiziert. Die Kammer wurde mit 1,5 ml 1 mM NAD<sup>+</sup>, 1 µM FMN, 1 mM TCEP in 40 % O<sub>2</sub>, 60 % H<sub>2</sub> 50 mM TrisHCl-Puffer pH 8,0 gefüllt und mit 50-200 pmol Enzym gestartet.

Die Bildung von Superoxid wurde durch die Oxidation von Hydroxylamin zu Nitrit nach einem modifizierten Protokoll von (Schneider und Schlegel 1981) quantifiziert. Die Reaktion wurde bei 30 °C in 450 µl 0,5 mM Hydroxylaminhydrochlorid 40 % O<sub>2</sub>, 60 % H<sub>2</sub> 50 mM TrisHCl pH 8,0, 1 mM NADH, 1 mM TCEP, 1 µM FMN und 20-50 µg SH durchgeführt. Die Bildung von Nitrit wurde durch Messung der Absorption bei 530 nm in einer 96-Vertiefungs-Mikrotiterplatte nach der Zugabe von gleichen Volumina (2,33 mM)  $\alpha$ -Naphthylamin und (6,33 mM) Sulfanilsäure zu einem 33 µl Probenansatz bei unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt. Natriumnitrit wurde als Standard verwendet. Wenn erforderlich, wurde Superoxiddismutase (SOD, Cu-Zn-SOD aus Rinder-Erythrozyten, Sigma) zugegeben. Bei

NADH-abhängigen Superoxid-Messungen wurde 1 mM NADH anstelle von  $\text{NAD}^+$  und 40 %  $\text{O}_2$ , 60 %  $\text{N}_2$  eingesetzt. Für Experimente zur Bestimmung reduzierter Sauerstoffspezies wurden die Ansätze in 5,2 ml-Reaktionsgefäßen, die mit einem Gummideckel verschlossen waren, mit 40 %  $\text{O}_2$  und 60%  $\text{H}_2$  für die wasserstoffabhängige  $\text{NAD}^+$ -Reduktion bzw. mit 40 %  $\text{O}_2$  60 %  $\text{N}_2$  für die reverse Reaktion inkubiert.

Die Bildung von Wasserstoffperoxid wurde durch den Amplex Red<sup>TM</sup> Reaktionsansatz (Sigma) quantifiziert. In Kombination mit Meerrettichperoxidase (HRP) reagiert die Amplex Red<sup>TM</sup> Reagenz mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu dem fluoreszierenden Oxidationsprodukt Resorufin. Die Reaktion wurde bei 30 °C in 600 µl 1 mM  $\text{NAD}^+$ , 1 µM FMN, 40 %  $\text{O}_2$ , 60 %  $\text{H}_2$  mit 20-50 µg SH in 5,2 ml verschlossenen Röhrchen durchgeführt. Bei NADH-anhängigen  $\text{H}_2\text{O}_2$  Messungen wurde 1 mM NADH anstelle von  $\text{NAD}^+$  und 40 %  $\text{O}_2$  60 %  $\text{N}_2$  eingesetzt. 50 µl Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen, bei 80 °C für 2 min gestoppt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Für die Wasserstoffperoxid-Quantifizierung wurden 50 µl mit 1 µM Amplex Red<sup>TM</sup> und 2 mU/ml HRP in 50 mM TrisHCl pH 8,0 hinzugefügt. Nach 30 min bei Raumtemperatur wurde die Bildung von Resorufin durch Fluoreszenz bei einer Anregung bei 571 nm und Emission bei 585 nm mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Standards bestimmt. NADH und FMN interferieren mit dem Amplex Red<sup>TM</sup> und HRP-System (Votyakova und Reynolds 2004), daher wurde die Hintergrundfluoreszenz eines Ansatzes, der alle Bestandteile mit Ausnahme des Enzyms beinhaltet, von den eigentlichen Reaktionsansätzen subtrahiert. DTT und TCEP stören den  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Test, daher wurde auf beide Reduktionsmittel verzichtet.

Die  $\text{H}_2\text{O}$ -Bildung wurde durch ein Quadrupol-Massenspektrometer (Pfeiffer OmniStar<sup>TM</sup> GSD 301) in Kombination mit isotopisch markierten stabilen  $^{18}\text{O}_2$  detektiert. Die Reaktion wurde bei 30 °C in 30 µl 1 mM  $\text{NAD}^+$ , 1 µM FMN, 1 mM TCEP, 40 %  $^{18}\text{O}_2$ , 60 %  $\text{H}_2$  mit 50-1000 µg SH in 5,2 ml geschlossenen Reaktionsgefäßen inkubiert. Im Falle von NADH wurde 100 mM NADH statt  $\text{NAD}^+$  und 60 %  $\text{N}_2$  statt 60 %  $\text{H}_2$  eingesetzt. 10 µl Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten genommen, in einem verschlossenen 1,5 ml Gefäß mit einem eisgekühlten Deckel für 20 min bei 100 °C inaktiviert, verdampft, und das sich im Deckel befindende Kondenswasser wurde durch Zentrifugation in einem neuen Röhrchen bei 4000 x g für 1 min gesammelt. Dadurch wurde sichergestellt, dass die Kapillare des MS nicht durch Salze, Chemikalien und Proteine im Reaktionsgemisch blockiert wird. 7 µl der kondensierten Probe wurde direkt auf der Öffnung der Kapillare aufgebracht, die auf 160 °C erhitzt wurde. Eine Durchflussgeschwindigkeit von etwa 4 ml/min wurde eingestellt und m/z

von 2 ( $\text{H}_2$ ), 18 ( $\text{H}_2^{16}\text{O}$ ), 20 ( $\text{H}_2^{18}\text{O}$ ), 32 ( $^{16}\text{O}_2$ ), 36 ( $^{18}\text{O}_2$ ), 38 ( $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ ), 44 ( $\text{CO}_2$ ) und deren Fragmente wurden aufgezeichnet.

#### 2.4.5 Kofaktor-Quantifizierung

Die Quantifizierung des Metallgehaltes der Proteinproben wurde mit einem Totalreflektions-Röntgenfluoreszenz (TXRF)-Spektrometer (Fa. Bruker PICOFOX) in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Haumann, Freie Universität Berlin, durchgeführt (Klockenkämper 1997). Die 8  $\mu\text{l}$  Proben wurden mit 8  $\mu\text{l}$  eines 10 mg/l Gallium-Standards (Sigma) gemischt und davon wurden 5  $\mu\text{l}$ -Aliquots auf Quarz-Probhalter aufgebracht, die für 20 min bei 50 °C getrocknet wurden. Die Röntgenfluoreszenz wurde für 20 min gesammelt. Metallkonzentrationen in den Proteinproben wurden mit Bezug auf den Gallium-Standard durch die eingebauten Routinen des Spektrometers bestimmt. Alternativ dazu wurde der Metallgehalt durch optische Emissionsspektrometrie mittels induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) (Optima 2100 DV, PerkinElmer Life Sciences) unter Verwendung einer Multi-Element Standardlösung XVI (Merck) als Referenz in Kooperation mit Silke Leimkühler, Universität Potsdam, quantifiziert. Die Flavinmononukleotid-Konzentrationen wurden fluorimetrisch nach einer für 96-Vertiefungs-Mikrotiterplatten modifizierten Methode (Schneider und Schlegel 1978) mit einem Spektrofluorometer (Spectramax Spektrofluorometer M4) analysiert. Die Enzymprobe wurde bei 4 °C mit gleichen Volumen von eiskalter 20 % Trichloressigsäure gemischt. Nach 15 min wurde die Probe bei 5000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort mit demselben Volumen von 4 M  $\text{K}_2\text{H}(\text{PO})_4$  neutralisiert. Die Freisetzung von FMN wurde durch seine Fluoreszenz bei einer Anregung bei 460 nm und Emission bei 526 nm mit bekannten FMN Konzentrationen (73-79 % fluorometrischer Grad, Sigma) bestimmt und anschließend mit reinen FMN-Standards (95 %, Sigma) normiert.

#### 2.4.6 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

Die Proteine wurden per diskontinuierlicher SDS-PAGE („Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“) unter denaturierenden Bedingungen nach (Laemmli 1970) aufgetrennt. Die Acrylamidkonzentration betrug für die Sammelgele 4 % und für die Trenngele 12 %. Minigele (10 x 8 x 0,1 cm) in der Vertikalgelkammer MTV-1 der Firma Cti (Idstein, Germany) wurden verwendet. Vor dem Beladen der Gele wurden die Proteinproben mit 6-fach konzentrierten Probenpuffern (0,5 M Tris/HCl, pH 6,8, 33 % (v/v) Glycerin, 0,6 M DTT, 10 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und für 5 min bei 100 °C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte bei 35 mA (Netzgerät ECPS 3000/150, Pharmacia) im Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS). Als Molekulargewichtsstandard

wurde der "Precision Plus Protein Dual Color Standard" (10-250 kDa; BIO-RAD, USA) eingesetzt.

Die Visualisierung von Proteinbanden im Polyacrylamidgel erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Wilson (Wilson 1983). Hierzu wurden die Gele für 30 min in einer Färbelösung (425 ml 96 % (w/v) Ethanol, 100 ml Essigsäure, 50 ml Methanol, 42 ml H<sub>2</sub>O, 2,0 g Coomassie Brilliant Blue R-250 und 0,5 g Coomassie Brilliant Blue G-250 (SERVA, Germany)) geschwenkt und anschließend mit Entfärbelösung (250 ml Methanol, 50 ml Eisessig; ad 1000 ml dd H<sub>2</sub>O) für mindestens 16 h unter kontinuierlichem Schwenken inkubiert, so dass Proteine als blaue Banden sichtbar wurden.

#### *2.4.7 Immunologische Detektion der Proteine*

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurden diese im Semi-Dry-Blotverfahren (PEQLAB PerfectBlue™ SemiDry Electrobloetter Sedec™) auf eine Nitrocellulosemembran (BioTrace NT, Pall, USA) übertragen (Towbin *et al.* 1979). Nach dem Proteintransfer wurde die Blotmembran für mindestens 30 min in Blockpuffer (3% Skim Milk Powder; Fluka, Germany in TBST-Puffer mit 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05% v/v Tween 20) geschwenkt und anschließend mit primären Antikörper gegen entweder HoxF, HoxU, HoxH, HoxY, HoxG oder HoxC (Verdünnung 1:500-1:10000 in TBST-Puffer) für 1 h inkubiert. Danach wurde drei Mal für 5 min mit TBST-Puffer gewaschen und eine 1 h Inkubation mit sekundären Antikörpern (Ziege anti-Kaninchen IgG-Alkalische Phosphatase Konjugat, Dianova, Germany, Verdünnung 1:20000 in TBST-Puffer) erfolgte. Anschließend wurde die Membran zweimal in TBST-Puffer und einmal in Entwicklungspuffer (100 mM Tris/HCl, pH9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) für jeweils 5 min gewaschen. Für die Farbreaktion wurde die Membran in Entwicklungspuffer mit 50 µg/ml BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat Roth, Germany) und 100µg/ml NBT (p-Nitroblautetrazoliumchlorid AppliChem, Germany) inkubiert. Die alkalische Phosphatase-abhängige Farbreaktion wurde durch Waschen mit H<sub>2</sub>O gestoppt.

#### *2.4.8 Aufnahme von UV-Vis-Absorptionsspektren*

Die Aufnahme von UV-Vis-Spektren erfolgte im Zweistrahl-UV-Vis-Spektrometer (Cary 5000 von Varian™, Palo Alto, USA). Die Messung wurde in 100-µl-Quarzküvetten (Varian) bei 16 °C und einer Scangeschwindigkeit von 600 nm pro min im Wellenlängenbereich von 200-800 nm durchgeführt. Als Referenz diente der jeweilige Lagerungspuffer. Für Messungen des Spektrums einer oxidierten Probe wurden 110 µl der Probe direkt nach der Reinigung eingesetzt. Zur Reduktion wurde die gleiche Probe mit einem Gummiseptum luftdicht

verschlossen, zum Anaerobisieren für 15 min mit Wasserdampf gesättigtem Argon gespült und anschließend mit Dithionit reduziert.

#### 2.4.9 Fourier-Transform-Infrarot(FTIR-) Spektroskopie und Fit-Prozedur

Die FTIR-Spektren wurden in Zusammenarbeit mit Marius Horch, Philip Hummel und Dr. Ingo Zebger am Max-Volmer-Labor für Biophysikalische Chemie an der Technischen Universität Berlin mit einem Tensor 27- oder einem IFS28-Spektrometer der Firma Bruker (Deutschland) aufgenommen. Dies geschah mit in flüssigem Stickstoff gekühlten Mercury-Cadmium-Tellurid (MCT)-Detektoren und einer spektralen Auflösung von  $2\text{ cm}^{-1}$ . Der Probenraum wurde dabei mit getrockneter Druckluft oder Stickstoff gespült und die zu untersuchende Probe (100–200  $\mu\text{M}$  Protein) wurde in einer gasdichten, temperaturkontrollierten IR-Flüssigkeitszelle mit  $\text{CaF}_2$ -Fenstern bei  $10^\circ\text{C}$  gemessen (Zellvolumen  $\sim 7\text{ }\mu\text{l}$ , optische Weglänge =  $50\text{ }\mu\text{m}$ ). Für ein Spektrum erfolgte die Addition von 200 Scans. Um das Signal/Rausch-Verhältnis zu verbessern, wurden bis zu 30 Spektren gemittelt. Die Spektren wurden mit der OPUS 5.5 Software unter Verwendung einer Spline-Funktion Basislinien-korrigiert. Reduzierte SH-Proben wurden bei Raumtemperatur durch 30-minütige Inkubation mit 5-10 mM NADH in einer mit Stickstoff gefüllten anaeroben Box präpariert. Mit Wasserstoff reduzierte Proben wurden in einem mit Formiergas (95-97 %  $\text{N}_2$ , 3-5 %  $\text{H}_2$ ) gefüllten Anaerobenzelt nach Inkubation mit 1 mM NADH und 1 bar  $\text{H}_2$  hergestellt. Reduziertes HoxHY-Modul wurde bei Raumtemperatur 30 min mit 1 bar  $\text{H}_2$  und 2-5 mM FMN in dem zuvor genannten Anaerobzelt inkubiert. Die reduktive Aktivierung durch chemische Mittel wurde durch Inkubation mit 7,7 mM DT, 5 mM MV erreicht.

Für die *in situ*-Spektroskopie wurden resuspendierte Zellen mit einer  $\text{OD}_{436}$  von ca. 2000 eingesetzt. Für die SH-Oxidation wurden die Zellen durch Inkubation mit  $33\text{ mg ml}^{-1}$  CTAB permeabilisiert (Friedrich *et al.* 1981). Oxidation fand entweder anaerob durch Zugabe von 5 mM  $\text{NAD}^+$  oder durch Luftsauerstoff statt. Alternativ wurde die Oxidation der Zellen durch drei Gefrier-Auftau-Zyklen unter Luftatmosphäre durchgeführt. Reduzierte SH wurde bei Raumtemperatur durch Inkubieren ganzer Zellen mit 1 bar  $\text{H}_2$  für 30 min in dem oben beschriebenen Anaerobzelt hergestellt.

#### 2.4.10 EPR-Spektroskopie

Die 9,5 GHz X-Band Spektren von SH-Derivaten (100  $\mu\text{l}$  50-100  $\mu\text{M}$ ) wurden von Dr. Miguel Saggiu am Max-Volmer-Labor für Biophysikalische Chemie an der Technischen Universität Berlin an einem EPR-Spektrometer des Typs Bruker ESP300E Spektrometer mit einem rechteckigen Mikrowellenhohlraumresonator (Bruker, Deutschland) im TE102-Modus

durchgeführt. Für Tieftemperaturmessungen 10-100 K wurde die Probe in einem Oxford ESR-900-Helium-Durchflussskryostaten (Oxford ITC4, Oxford Instruments, UK) gekühlt. Die durch standardmäßige CW-(continuous wave) EPR-Spektroskopie aufgenommenen Absorptionsspektren wurden meist als erste Ableitung aufgezeichnet und dargestellt. Die Basislinienkorrektur erfolgte durch Abzug eines Hintergrundspektrums, welches mit der entsprechenden Pufferlösung aufgenommen wurde. Zur Spin-Quantifizierung wurde das doppelt integrierte Signal mit dem Signal eines  $\text{Cu}(\text{SO}_4)$ -Standard bekannter Konzentration verglichen. Die SH-Proben wurden analog wie im vorigen Kapitel beschrieben präpariert, in EPR-Röhrchen mit einem inneren Durchmesser von 3 mm überführt, in flüssigem  $\text{N}_2$  schockgefroren und gelagert.

#### 2.4.11 Röntgenabsorptionsspektroskopie

Die röntgenabsorptionsspektroskopischen (X-ray absorption spectroscopy, XAS) Messungen der SH-Derivate wurden von Dr. Michael Haumann von der Freien Universität Berlin an der Beamline KMC-1 am BESSY (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Die  $K_\alpha$  Fluoreszenz-detektierte XAS-Spektren wurden an der Fe-Kante unter Verwendung eines Doppel-Kristall (Si111) Monochromators mit einem mit flüssigem Helium auf 20 K gekühlten Probenhalter (Oxford) und einem 13-Element Ge-Detektor (Canberra) gesammelt.

Die XAS-Spektren (6-10 Scans) wurden nach Energie-Kalibrierung der einzelnen Scans mit dem ersten Flexionspunkt bei 7112 eV im Absorptionsspektrum einer Eisen-Folie als Energie-Standard gemittelt. Die Normalisierung der Spektren und Extraktion der EXAFS-Oszillationen wurde - wie zuvor beschrieben - durchgeführt (Dau *et al.* 2003). Die Energieskala von EXAFS-Spektren wurde zur Wellenvektor ( $k$ )-Skala mit einem Wert von  $E_0$  7112 eV umgewandelt. Ungefilterte  $k^3$ -gewichtete Spektren wurden für Kurvenanpassung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate verwendet und die Fouriertransformationen mit dem Programm SimX auf der Basis der berechneten Phasenfunktionen durch FEFF8.4 (Zabinsky *et al.* 1995) und einer Amplitudenreduktionsfaktor ( $S_0^2$ ) von 0,9 durchgeführt (Dau *et al.* 2003).

#### 2.4.12 Elektrochemie

Elektrochemische Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Juan Liu, Zul Idris und Dr. Kylie Vincent von der Oxford Universität durchgeführt. Die Experimente fanden in einer  $\text{N}_2$  gefüllten anaeroben Box ( $\text{O}_2 < 1$  ppm; M. Braun, Deutschland) in einer elektrochemischen Messzelle (4 ml) mit einem Wassermantel für die Temperaturkontrolle statt, der durch einen O-Ring zu einem Elektrodenrotor abgedichtet wurde. Die Messzelle war mit einem Gaseingang und -ausgang versehen, um einen Austausch von Gasen mit dem Kopfraum zu



gewährleisten und enthielt zudem ein Septum für Injektionen. Gasmischungen wurden durch einen Durchflusskontroller (Brooks SLA Series mit Digibox Lite) eingestellt. Eine pyrolytische Graphit 'edge' (PGE) rotierende Scheibenelektrode (Fläche 0,03 cm<sup>2</sup>) wurde mit einem Elektrodenrotor (EG&G 636) eingesetzt. Potentiale wurden durch einen Autolab128N oder 302N Potentiostaten eingestellt (EcoChemie, Niederlande). Die Gegenelektrode war eine Platinelektrode. Eine Ag/AgCl (3 mM NaCl)-Elektrode wurde für die Hydrogenase-Modul-Experimente als Referenz eingesetzt. Potentiale, die mit Hilfe der Ag/AgCl-Elektrode aufgenommen wurden, wurden mit Hilfe der folgenden Formel auf die Standardwasserstoffelektrode (SHE) bezogen:

$$E(\text{SHE}) = E(\text{Ag/AgCl}; 3 \text{ m NaCl}) + 0,201 \text{ V bei } 30^\circ\text{C} \text{ oder } + 0,216 \text{ V bei } 10^\circ\text{C}.$$

Für das Diaphorase-Modul wurde eine kalometrische Elektrode (Quecksilber/Quecksilber(I)-chlorid, SCE) eingesetzt und zu V vs. SHE mit der folgenden Formel umgewandelt:

$E(\text{SHE}) = E(\text{SCE}) + 242 \text{ mV bei } 25^\circ\text{C} (+238 \text{ mV bei } 30^\circ\text{C})$ . Um einen Proteinfilm zu präparieren, wurde die PGE für 30 s mit einer wässrigen  $\alpha$ -Aluminiumoxid-Suspension (1  $\mu\text{m}$ , Buehler, Germany) poliert, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und für 10 s mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurde 0,5  $\mu\text{l}$  Enzym (0,4-1 mg/ml) auf die Elektrode pipetiert und für 30 s inkubiert, bevor überflüssige Enzymlösung entfernt, die PGE mit enzymfreiem Puffer abgespült und in die elektrochemische Zelle eingesetzt wurde. Die Elektrode wurde mit 2000 bis 2500 rpm rotiert, um eine optimale Versorgung an Substrat und eine optimale Entsorgung an Produkt zu gewährleisten. Alle Diaphorase-Modul-Experimente wurden in 50 mM Tris-HCl pH 8,0 Puffer durchgeführt. Für das Hydrogenase-Modul ist der betreffende Puffer im Ergebnisteil angegeben. Für elektrochemische K<sub>M</sub>- und K<sub>i</sub>-Wert-Bestimmungen wurde NADH (Melford) und NAD<sup>+</sup> (Sigma oder Melford) durch eine Ionenaustauscher-Chromatographie mit einer Q HyperD F Säule (Pall Corporation) weiter gereinigt und Konzentrationen der Eluatfraktionen durch Vergleich bei Absorption bei 340 nm und 260 nm mit Standards bestimmt. Aliquots von NAD<sup>+</sup> und NADH wurden von Stammlösungen in die Messzelle hinzugegeben. Ein Film aus "totem" HoxHY wurde für die Berücksichtigung des kapazitiven Beitrags der Proteinbeladung der Elektrode hergestellt, indem der Proteinfilm bei 0,5 V oxidativ geschädigt wurde.

#### 2.4.13 Kristallisationsansätze

Kristallisationsansätze zur Strukturaufklärung erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Hideaki Ogata vom Max Planck Institut für Bioanorganische Chemie, Mülheim an der Ruhr, mit frischen SH-Präparationen (ohne Einfrieren) in 96-Vertiefungs-MRC-Platten (Jena Bioscience) mittels der *sitting-drop*-Methode. Das Reservoir wurde mit 90  $\mu\text{l}$  des jeweiligen

Puffers versetzt, jeweils 0,3 µl des Puffers wurden in den Vertiefungen vorgelegt. Anschließend wurde die Protein-Lösung (0,3 µl, 5-100 mg ml<sup>-1</sup>) in die Vertiefungen gegeben, und die Vertiefungen wurden mit einer klaren, gasdichten Folie (Jena Bioscience, Deutschland) verschlossen. Verschiedene kommerzielle Kristallisation-Reihenuntersuchungen wurden eingesetzt (Jena Bioscience, Deutschland). Die Platten wurden bei 4 °C inkubiert und mikroskopisch über einen Zeitraum von etwa drei Wochen überprüft.

## **2.5 DNA-Grundtechniken**

### *2.5.1 Behandlung von Geräten und Lösungen*

Hitzebeständige Geräte und Lösungen wurden durch Autoklavieren (121 °C bei gesättigtem Wasserdampf für 20 min) sterilisiert sowie von DNase-Aktivität befreit und anschließend für 2 bis 3 Tage bei 70 °C getrocknet. Glasgefäße wurden z. T. bei trockener Hitze (180 °C für 6 h) sterilisiert. Hitzelabile Lösungen wurden gegebenenfalls sterilfiltriert (Porendurchmesser 0,2 µm).

### *2.5.2 Konzentrationsbestimmung der DNA bzw. RNA*

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte durch Messung in einem Spektrophotometer (Nanodrop) bei 260 nm. Zur Feststellung des Reinheitsgrades wurde außerdem die Absorption bei 280 nm bestimmt. Das Verhältnis A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> liegt für reine DNA um 1,8 (Sambrook und Russell 2006).

### *2.5.3 Restriktionsverdau von DNA*

Der Restriktionsverdau von DNA erfolgte nach Herstellerangaben (New England Biolabs) in 50 µl Reaktionsansätzen.

### *2.5.4 Dephosphorylierung von DNA*

Um intra- und intermolekulare Ligation der geschnittenen Vektorfragmente im Ligationsansatz zu verhindern, wurden die 5'Enden mit alkalischer Phosphatase (CIP, *calf intestinal - phosphatase*, New England Biolabs) nach Herstellerangaben dephosphoryliert.

### *2.5.5 Ligation von DNA-Fragmenten*

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, USA) unter den von der Bezugsfirma vorgegebenen Bedingungen. Bei Ligation von überhängenden Enden wurde Insert und Vektor im Verhältnis 3:1 eingesetzt und der Ligationsansatz für 2 - 12 h bei 16 °C inkubiert. Bei glatten Enden wurde der Ligationsansatz für 8-2 h bei RT inkubiert.



## 2.6 DNA-Isolierung

Zur Reinigung nach Modifikation der DNA wurde der Reaktionsansatz nach dem Spin PCRapace Kit (Invitek, Berlin) gereinigt und in 10 mM TrisHCl pH 8,0 eluiert.

## 2.7 Plasmidisolation

Für Plasmidisolationen aus *E. coli* wurden 1,5 ml einer Übernacht-Kultur in einem Reaktionsgefäß geerntet und der Überstand verworfen (modifiziert nach (Birnboim und Doly 1979). Das Pellet wurde in 100 µl Lösung I (25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 mg/ml RNase) resuspendiert. Die alkalische Lysis erfolgte durch Zugabe von 200 µl Lösung II (0,2 N NaOH, 1 % (w/v) SDS). Durch Zugabe von 200 µl Lösung III (3 M K-Acetat, pH 4,8) wurden die Lösung neutralisiert und Proteine präzipitiert. Nach einer Zentrifugation ( $15000 \times g$ , 3 min) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA nach Zugabe von 1000 µl eiskaltem, absolutem Ethanol abzentrifugiert ( $15000 \times g$ , 7 min). Das nach Waschen mit 70 % (w/v) Ethanol erhaltene Pellet wurde im Vakuum getrocknet und anschließend in 50 µl 1 mM TrisHCl pH 8,0 gelöst.

Zur Isolierung von hochreiner Plasmid-DNA aus *E. coli* über Anionenaustauscher-Säulen wurde das Invisorb Spin Plasmid Mini Two (250) Kit (Invitek GmbH, Berlin) verwendet. Die Aufarbeitung erfolgte nach Vorgaben des Herstellers. Zur Isolierung einer großen Menge an reinem Plasmidmaterial, besonders von Plasmiden mit geringer Kopienzahl, wie z. B. pEDY309, wurde das „Qiagen Tip 100 Kit“ benutzt und es wurde nach Handbuch verfahren.

## 2.8 Elektrophoretische Auftrennung der DNA in Agarosegelen

Die elektrophoretische Trennung von Nukleinsäure-Fragmenten erfolgte in horizontalen Gelkammern (100 x 70 x 2,5 mm Werkstätten der FU und HU Berlin). Die Gele wurden mit 0,5 % bis 2 % w/v hochschmelzender Agarose (Invitrogen) in Tris-Phosphat-EDTA-Puffer (TPE-Puffer: 80 mM Tris, 8 mM EDTA; pH 7,6 mit 85 % w/v Phosphorsäure eingestellt) angesetzt. Die Elektrophorese erfolgte in TPE-Puffer bei einer Spannung von 90 V. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit 0,2 Volumenanteilen Farbstoff-Schwerelösung (33 % v/v Glycerin in TPE-Puffer, 0,07 % w/v Bromphenolblau) versetzt. Zur Detektion der DNA-Banden für analytische Zwecke wurden die Gele in einer Ethidiumbromid-Lösung (2 µg/ml) inkubiert. Die Sichtbarmachung der markierten DNA erfolgte mittels eines UV-Transilluminators bei 254 nm. Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten im Agarosegel wurde 2-Log DNA Leiter (0,1–10,0 kb; New England Biolabs, USA) eingesetzt. Für präparative Zwecke erhielten die Agarosegele zusätzlich Gel-Red (Biotium), so dass auf eine

Nachfärbung verzichtet werden konnte. Anregung der markierten DNA fand bei 280 nm statt und die Emission wurde bei 600 nm verfolgt.

### **2.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Zur Gewinnung der DNA aus präparativen Agarosegelen wurde das "QIAEX II Gel Extraction Kit" (Qiagen, Germany) verwendet und es wurde nach Handbuch verfahren.

### **2.10 Herstellung kompetenter Zellen**

Für Transformationen von Plasmid-DNA in die *E. coli*-Stämme D10 $\beta$  und S17-1 wurden diese durch das folgende Verfahren in einen kompetenten Zustand gebracht: 100 ml eines vorgewärmten LB-Mediums (37 °C) wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur beimpft und für 2-3 h bei 37 °C auf dem Rotationsschüttler bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,8 inkubiert. Die Zellen wurden mit 4000 rpm bei 4 °C geerntet, das Zellpellet in 30 ml eiskaltem TFB1-Puffer (100 mM RbCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM Na-Acetat, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % (v/v) Glycerin, pH 5,8 sterilfiltriert) resuspendiert und 90 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und in 4 ml eiskaltem TFBII-Puffer (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % w/v Glycerin; pH 6,8 mit KOH eingestellt, sterilfiltriert) resuspendiert. Die nunmehr chemisch-kompetenten Zellen wurden in 100  $\mu$ l Aliquots in vorgekühlte 2 ml-Eppendorfgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### **2.11 Transformation**

Zur DNA-Übertragung wurden die gefrorenen kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 7  $\mu$ l des Ligationsansatzes oder mit 1  $\mu$ l der Plasmidpräparation versetzt, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis gestellt. Darauf folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 Sekunden, woraufhin die Zellen wieder 2 min auf Eis gestellt wurden. Anschließend wurden 0,9 ml LB-PSI-Medium (LB Medium, 4 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM KCl) zugegeben und die Zellen 60 min bei 37 °C auf einem Rotationsschüttler (450 rpm) inkubiert. Anschließend wurden 0,05-0,9 ml der transformierten Zellen auf geeignetem Selektivmedium ausplattiert.

### **2.12 Konjugation**

Durch konjugativen Transfer mobilisierbare Plasmide wurden mit Hilfe von dem Donatorstamm *E. coli* S17-1, der die *tra*-Gene des Plasmids RP4 auf dem Chromosom enthält, in die Rezipienten *R. eutropha* oder *P. putida* durch „Spotmating“ übertragen (Friedrich *et al.*, 1981). Donor und Rezipient wurden über Nacht in jeweils 10 ml LB- (*E. coli*, *P. putida*) bzw. NB-Medium (*R. eutropha*) mit entsprechendem Antibiotikum angezogen. Die über Zentrifugation (10 min. 4000 rpm, RT) gewonnenen Zellpellets wurden in jeweils 5 ml sterilem H16-Puffer (25 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,0) gewaschen

und nach erneuter Zentrifugation in je 1 ml H16-Puffer aufgenommen. Je 0,2 ml dieser Zellsuspensionen wurden auf einer NB-Platte zusammen ausplattiert und 4 bis 12 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde Zellmaterial mit einer sterilen Pipettenspitze abgenommen und in 5 ml H16-Puffer resuspendiert. Schließlich wurden geeignete Verdünnungsstufen ( $10^0$  bis  $10^{-5}$ ) auf FN-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und etwa 48 h bei 37 °C inkubiert. Für den Allelaustausch durch doppelte homologe Rekombination wurde der Vektor pLO1 (Lenz *et al.* 1994) verwendet. Dieser Vektor basiert auf dem ColE1-Replikon und trägt neben dem *neo*-Gen für eine Kanamycinresistenz auch das *sacB*-Gen aus *Bacillus subtilis*, das für eine Laevan-Saccharase codiert, welches bei Vorhandensein von Saccharose im Medium zur Synthese und Anhäufung von Laevan im Periplasma gramnegativer Bakterien und letztendlich zur Lysis der Zellen führt (Gay *et al.* 1985). Der pLO1-Vektor ist von *E. coli* S17-1 nach *R. eutropha* mobilisierbar (*mob*<sup>+</sup>), kann aber nur nach der Integration in das Genom des Rezipienten stabil replizieren. Aus einer Konjugation hervorgegangene *R. eutropha*-Rekombinanten mit integrierten Suizidplasmiden wurden auf Kanamycin haltigen FN-Platten selektiert. Aus den resistenten Isolaten wurden über Reinigungsausstrich gewonnene Einzelkolonien in 10 ml NB-Medium ohne Antibiotikum bei 30 °C über Nacht inkubiert. Nach der Ernte der Kulturen und einem Waschschrift mit 5 ml H16-Puffer wurden die Zellen in geeigneten Verdünnungsstufen ( $10^0$  bis  $10^{-4}$ ) auf Selektiv-Medium (LB mit 15 % (w/v) Saccharose) ausplattiert. Stämme mit weiterhin präsentem *sacB*-Gen können unter diesen Bedingungen kein Wachstum zeigen. Wachsende, Saccharose resistente Rekombinanten hingegen, welche den konditional letalen Plasmidteil durch die zweite Rekombination wieder verloren hatten, wurden auf FN-Agarplatten erneut ausgestrichen und homogenote Rekombinanten wurden durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bestätigt (Kapitel 2.14).

### 2.13 Sequenzierung

Die Sequenzierung PCR-generierter Konstrukte erfolgte nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (Sanger *et al.* 1977) und wurde durch das molekularbiologische Labor von Dr. Martin Meixner, Services in Molecular Biology (Berlin, Germany) durchgeführt. Die Analyse von Sequenzdaten erfolgte unter Nutzung der Software FinchTV (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>).

### 2.14 Polymerase-Kettenreaktion

Zur *in vitro* Amplifikation doppelsträngiger DNA-Fragmente (Mullis und Faloona 1987) für analytische (Kontrolle von Rekombinanten) als auch für präparative Zwecke (*in-vitro*-

Amplifizierung von DNA-Fragmenten) wurde ein DNA Thermal Cycler PTC 255 (MJ Research, USA) eingesetzt. Nach dem initialen Aufschmelzen der DNA für 1-5 min bei 94-96 °C wurden 25 bis 30 Zyklen der anschließenden aufeinanderfolgenden Schritte wiederholt: 1 min, 96 °C zur Trennung des DNA-Doppelstrangs; 1 min 50-65 °C zur Anlagerung der Primer. Die genaue "Annealing"-Temperatur orientierte sich an der Schmelztemperatur eingesetzter Primer und wurde mit dem Programm Vector NTI berechnet (life technologies). Anschließend wurde für 0,5-1 min pro kbp das zu amplifizierende Fragment bei 68-72 °C inkubiert (je nach eingesetzter Polymerase). Abschließend nach 25-30 Zyklen wurde zum Auffüllen unvollständiger Amplifikate die DNA für 5 min bei 68-72 °C inkubiert. Die genauen Bedingungen und der Reaktionsansatz folgte den Herstellerangaben der eingesetzten Polymerasen (Taq-Polymerase, Invitrogen; Phusion, Long Amp Polymerase, NEB, PfuUltra Stratagene). Für Klonierungen wurde Phusion oder PfuUltra DNA-Polymerase mit 3'→5' Korrekturfunktion und somit geringerer Mutationshäufigkeit eingesetzt. Für analytische Einsätze wurde eine Kolonie-PCR mit Zellmaterial als Template durchgeführt. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde dafür eine sehr geringe Menge Zellmaterial direkt von einer Bakterienkolonie auf einer Agarplatte entnommen und direkt in den PCR-Ansatz überführt. Der initiale Schritt der PCR wurde auf 5 min bei 96 °C verlängert, um ein vollständiges Aufbrechen der Bakterienzellen zu gewährleisten. Zur Analyse wurden 2-µl-Aliquots der PCR-Ansätze mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt.

## **2.15 Gentechnische Konstruktionen**

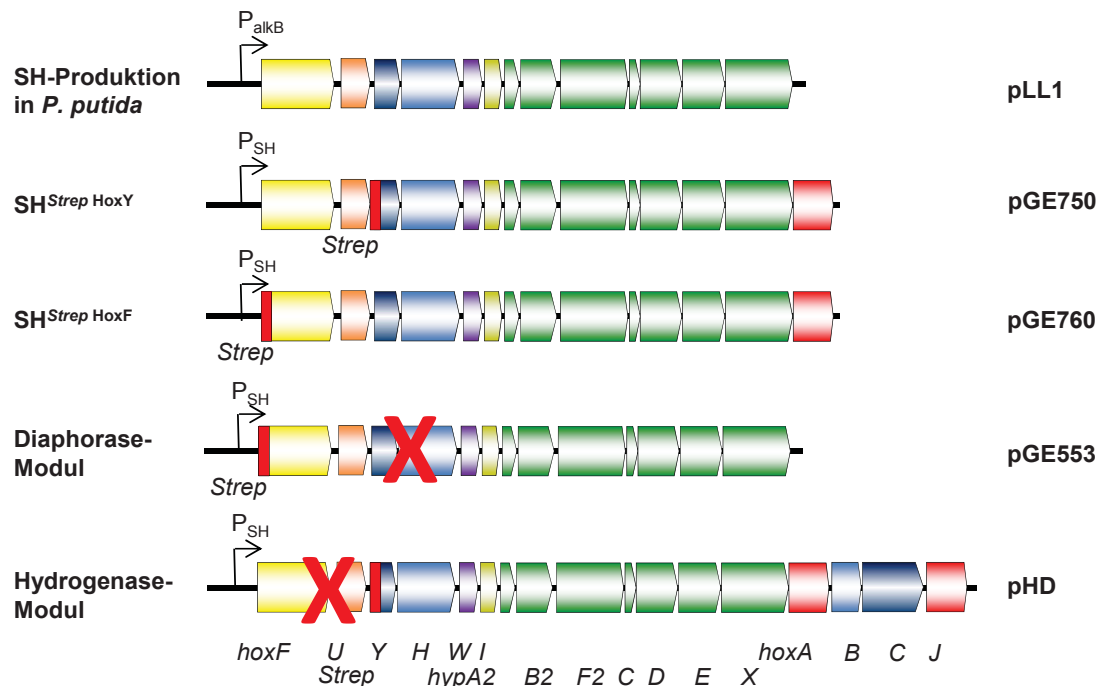
Für gentechnische Konstruktionen wurde *E. coli* D10β eingesetzt. Alle PCR-generierten Konstrukte wurden sequenziert. Die verwendeten Vektoren und Stämme sind in Tabelle 1 aufgelistet.

### **2.15.1 SH Expressionsplasmide**

Das Expressionsplasmid für die Affinitätsreinigung der SH aus *R. eutropha* wurde wie folgt konstruiert: Das verwendete Plasmid pGE770 enthielt *hoxF* mit einer N-terminalen *Strep*-tag II codierenden Sequenz und die *hoxFUYWihypA2B2F2CDEXhoxABCJ*-Gene unter Kontrolle des nativen SH-Promotors. Die Deletion der RH-Gene, *hoxBCJ*, wurde durch Transferieren des 14,9 kb-HindIII-Fragmentes aus pGE770 in das gleich geschnittene pCH1597 erreicht. Das Plasmid pCH1597 beinhaltete ein 1,6 kb SpeI/EcoRI-Fragment aus pCH646 in dem gleichermaßen verdauten Litmus28. Schließlich wurde ein 16,5 kb -SpeI/XbaI-Fragment aus dem resultierenden Plasmid pCH1595 in den 21,2 kb gleich verdaute pEDY309-Vektor ligiert und ergab pGE760.

Ein SH-Expressionsplasmid mit einem N-terminalen *Strep*-tag II an HoxY wurde unter Verwendung des Plasmids pG785 mit den *hoxFUYWHypA2B2F2CDEXhoxABCJ*-Genen als Basis gebaut. Die Deletion der RH-Gene, *hoxBCJ*, wurde durch Transferieren des 14,8 kb-HindIII-Fragmentes aus pCH1612 in das gleich geschnittene pCH1597 erreicht. Schließlich wurde ein 16,5 kb-SpeI/XbaI-Fragment aus dem resultierenden Plasmid pCH1617 in den gleichermaßen verdauten pEDY309-Vektor (21,2 kb-Fragment) ligiert. Dies ergab pGE785. Das 14,9 kb-HindIII-Fragment aus HF782, das HoxY mit einem N-terminalen *Strep*-tag II codiert, wurde in das gleich geschnittene 22,8 kb-Fragment aus pJH3001 inseriert, woraus sich pGE750 ergab. Eine Übersicht der verwendeten SH-Produktionsplasmide ist in Abbildung 5 dargestellt.

Um das HoxH<sup>I64A</sup>-Derivat (Burgdorf *et al.* 2002) mit einem analogen *Strep*-tag II auszustatten, wurde das 5,27 kb-FseI-PspOMI-Fragment aus pGE475, das den HoxH<sup>I64A</sup>-Austausch codiert, in das gleich geschnittene 13 kb-Fragment aus pCH1596 transferiert, was pCH1580 ergab. Anschließend wurde das 16,5 kb-SpeI/XbaI-Fragment aus pCH1580 in den XbaI-geschnittenen Vektor pEDY309 übertragen. Dies resultierte in pGE749. Die Plasmide pGE760, pGE750 und pGE749 wurden durch Konjugation in HF210 transferiert.



**Abb. 5:** Übersicht der genetischen SH-Konstrukte für die Produktion verschiedener SH-Derivate. Ein rotes X stellt die deletierten Untereinheiten dar.

Für die SH-Synthese in *P. putida* wurden die SH-codierenden Gene unter den  $P_{alkB}$ -Promoter gestellt. Das XhoI/HindIII geschnittene PCR-Produkt aus pSPZ10 wurde in das ebenso verdaute 3,8 kb-Fragment aus pCH1613 ligiert, das aus der Religation des 4,1 kb-EcoRI geschnittenen pTBu1058-Vektors stammte. Dies ergab pCH1614. Das resultierende 1,8 kb-

EcoRV/HindIII-Fragment wurde mit dem ebenso geschnittenen 4,46 kb-Fragment aus pTBU1085 ligiert, was pJH3180 ergab. Das 3,4 kb-BamHI/HindIII-Fragment wurde mit dem ebenso geschnittenen 2,8 kb-Litmus28-Fragment ligiert, woraus das Plasmid pJH3203 entstand. Das 12,5 kb XbaI/SapI-Fragment aus pGE770 in Litmus28 wurde mit dem 3 kb-XbaI/SapI-Fragment von pJH3203 *hoxF* ligiert, was pCH1616 ergab. Das 15,5 kb-Fragment aus pCH1616 wurde anschließend in den ebenso geschnittenen Vektor pEDY309 inseriert, was in Plasmid pLL1 resultierte. Durch Konjugation wurde pLL1 in *P. putida* transferiert.

### 2.15.2 Ortsspezifische Mutagenese

Der Austausch von Aminosäuren der NAD<sup>+</sup>-Bindetasche in HoxF wurde durch ortsgerichtete Mutagenese nach dem QuikChange® II XL Site-Directed MutagenesisKit (Agilent, USA) durchgeführt, wobei mutagene Primer mit dem Online Programm des Herstellers erstellt wurden (<http://www.genomics.agilent.com>).

Für den D340A-Austausch in HoxF (SH<sup>D340A</sup>) wurde das Primerpaar 1/2 verwendet, für den SH<sup>E341A</sup>-Austausch das Primerpaar 3/4, für SH<sup>D401K</sup> das Primerpaar 7/8, SH<sup>D467S</sup> das Primerpaar 9/10 und für SH<sup>D340A E341A</sup> das Primerpaar 11/12. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die verwendeten Primer. Als Ursprungsplasmid wurde pCH1582 verwendet, das das 2,0 kb-XbaI-PspMOI-Fragment aus pGE750 mit *hoxF* einschließlich dem SH-Promoter auf der Basis von pBluescriptII KS+ enthält. Für die Doppelsubstitutionen SH<sup>D340A D401K</sup> und SH<sup>D400K D467S</sup> wurde pCH1575 als Basis, und für SH<sup>E341A D467S</sup> wurde pCH1576 verwendet. Das 2,2 kb-XbaI-PspMOI-Fragment aus den resultierenden mutagenisierten Plasmiden wurde in das ebenso geschnittene 16 kb-Fragment aus pCH1581 ligiert, welches das 16 kb-XbaI-SpeI-Fragment mit den *hoxFUYHWHypA2B2F2CDEXA*-Genen und einer den N-terminalen *Strep*-tag II codierenden Sequenz am 5'-Ende von *hoxY* auf Litmus28-Basis beinhaltete. Anschließend wurde das 16 kb-XbaI-SpeI-Fragment aus den hervorgehenden Plasmiden in den 21 kb-XbaI-geschnittenen pEDY309-Vektor oder im Falle von SH<sup>D340A</sup>, SH<sup>E341A</sup> und SH<sup>D340A E341A</sup> in pCM62 inseriert. Die so entstandenen Plasmide mit breitem Wirtsspektrum wurden daraufhin über Konjugation in den megaplasmidfreien *R. eutropha*-Stamm HF210 transferiert. Eine detaillierte Übersicht der resultierenden Plasmide und Stämme ist in Tabelle 1 zu finden.

### 2.15.3 Genomische Deletionen

Für die Konstruktion von HF798 ( $\Delta hoxG \Delta hoxC$ ) wurde die SH-Synthese in HF500 ( $\Delta hoxH \Delta hoxG \Delta hoxC$  (Kleihues *et al.* 2000)) durch die Einführung des Wildtyp-Allels *hoxH* (pCH1500) in das Genom über Rekombination wiederhergestellt. Das *hoxH*-kodierende Plasmid pCH1500 wurde wie folgt hergestellt: ein 1,9 kb *hoxH*-enthaltendes Ecl136II-



Fragment aus dem Plasmid pCH472 (Massanz *et al.* 1997) wurde in den PmeI-geschnittenen pLO1-Vektor inseriert. Die zu HF798 analoge *hypX*-Deletionsmutante, HF799, wurde durch Deletion von *hoxC* durch Rekombination von pCH644 (Lenz und Friedrich 1998) in HF480 ( $\Delta hoxG \Delta hypX$  (Bleijlevens *et al.* 2004)) konstruiert. Für Komplementationsexperimente wurde *hoxFU* in *R. eutropha* HF798 unter Verwendung des konditional letalen Plasmids pCH1462 (Schwarze *et al.* 2011) in-frame deletiert, was zu HF903 führte.

## 2.16 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim) Merck (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Serva (Heidelberg) BIO-RAD (München), MWG Biotech (München) oder Roth (Karlsruhe) bezogen und waren mindestens analysenrein (p. a.). Restriktionsendonukleasen und DNA-modifizierende Enzyme lieferten New England Biolabs (Frankfurt) und Invitrogen (Karlsruhe). Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (München) und Sigma (München) bezogen. Ultrafiltrationseinheiten lieferte die Firma Millipore (Eschborn). Von der Firma Qiagen (Hilden) und Invitex (Berlin) wurden Kits für die Isolierung von Plasmid-DNA und von IBA (Göttingen) Säulenmaterial für die Aufreinigung von *Strep*-tag II-Fusionsproteinen bezogen. Gase lieferte die Firma Messer Griesheim (Frankfurt).

## 2.17 Dokumentation, Statistik und Datenverarbeitung

Strategien für Klonierungen wurden mit dem Computerprogramm Vector-NTI ausgearbeitet. Die Analyse von Sequenzchromatogrammen erfolgte mit Vector-NTI und FinchTV. Gefärbte Polyacrylamidgele und Western-Blots wurden zur Dokumentation mit einem Scanner (AtrixScan 1800f, Mikrotek) mit 300 bis 600 dpi digitalisiert. Zur Grafikbearbeitung wurde Adobe Photoshop X4, Adobe Illustrator und Microsoft PowerPoint 2010 genutzt. Microsoft Excel 2010 und CaryWin 3.0 wurden für die Auswertung von Aktivitätsmessungen und UV-Vis-Spektren verwendet. Statistische Berechnungen wurden durch Sigma plot 10.0 und Excel 2010 durchgeführt. Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten sind angegeben. Datenbankabgleiche erfolgten mit dem Programm BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) und multiple Aminosäuresequenzvergleiche wurde mit Hilfe des Programms ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) durchgeführt. Ein Homologie-Modell von HoxF wurde über SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) in automatischem Modus erstellt. Als Strukturtemplate diente die Kristallstruktur des peripheren Teils von Komplex I aus *Thermus thermophilus*, 2FUG, die über die „Protein Data Bank“ (Berman *et al.* 2000)



abgerufen wurde. PDB-Dateien wurden mit dem Programm Pymol 1.3 (Johnson und Srivastava 1993) analysiert und entsprechende Abbildungen wurden erzeugt.



### 3. Ergebnisse

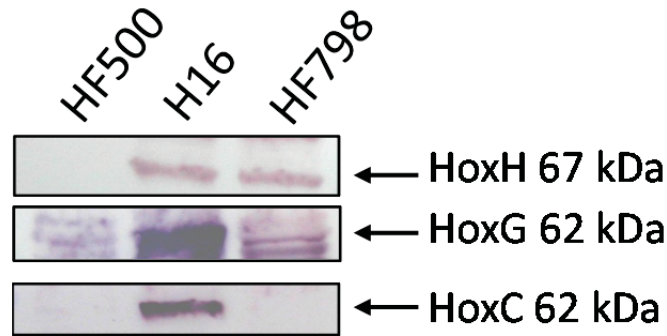
Im Rahmen dieser Arbeit sollten der strukturelle Aufbau und die O<sub>2</sub>-Toleranz der NAD<sup>+</sup>-reduzierenden Hydrogenase (SH) aus *Ralstonia eutropha* H16 sowie deren Anwendung in der Kofaktorregenerierung in gekoppelten Enzymreaktionen untersucht werden. Um die SH in ihrer physiologischen Umgebung, d. h. als Bestandteil des Cytoplasmas zu betrachten, wurde das [NiFe]-Zentrum der SH in ganzen Zellen von *R. eutropha* mit spektroskopischen Methoden untersucht. Um möglichst aktive und homogene Proben der isolierten SH für spektroskopische Untersuchungen zu bekommen, wurden die Kultivierungsbedingungen für die Produktion und Reinigung der SH optimiert. Des Weiteren wurden zwei Subformen der SH, das Hydrogenase- und das Diaphorase-Modul konstruiert, um die Untersuchung der SH zu erleichtern. Schließlich sollte der Produktion von reduzierten Sauerstoffspezies nachgegangen werden, um die Sauerstofftoleranz der SH erklären zu können. Auf dem Grundverständnis der Sauerstofftoleranz aufbauend, wurde die Anwendung der SH in der Kofaktorregenerierung betrachtet. Neben Fragen der SH-abhängigen Kofaktorregenerierung sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, wurde das Substratspektrum der SH um NADP<sup>+</sup> erweitert.

#### 3.1 Untersuchung des [NiFe]-Zentrums der SH mit *in-situ*-EPR- und FTIR-Spektroskopie

Das Modell der Sauerstofftoleranz der SH mit vier CN-Liganden am [NiFe]-Zentrum wurde durch biochemische und spektroskopische *in vitro*-Studien aufgestellt (Erkens *et al.* 1996; Happe *et al.* 2000; van der Linden *et al.* 2004; van der Linden *et al.* 2006). Daher sollte dieses Modell *in vivo* überprüft werden und die SH in ihrer physiologischen Umgebung, d. h. als Bestandteil des Cytoplasmas in einem kombinierten EPR- und FTIR-spektroskopischen Ansatz untersucht werden.

##### 3.1.1 Konstruktion einer RH- und MBH-negativen *R. eutropha*-Mutante

Die hier beschriebenen Experimente wurden mit dem Wildtyp-Derivat *R. eutropha* HF798 durchgeführt, das ausschließlich die SH synthetisiert, um eine Interferenz der SH-spezifischen spektroskopischen Signale mit denen der RH und MBH auszuschließen. Dafür wurde die SH-Synthese in *R. eutropha* HF500 ( $\Delta hoxH$ ,  $\Delta hoxG$ ,  $\Delta hoxC$  (Kleihues *et al.* 2000)) durch Wiedereinführung eines *hoxH*-Wildtyp-Allels in das Genom über homologe Rekombination wiederhergestellt.



**Abb. 6: Immunologischer Nachweis für die erfolgreiche Eliminierung der großen Untereinheiten von RH und MBH im Stamm *R. eutropha* HF798.** Eingesetzt wurden polyklonale Antiseren gegen HoxG, HoxC und HoxH. Als Positivkontrolle wurde *R. eutropha* H16 (SH<sup>+</sup>, MBH<sup>+</sup>, RH<sup>+</sup>) verwendet, als Negativkontrolle diente *R. eutropha* HF500 (SH<sup>-</sup>, MBH<sup>-</sup>, RH<sup>-</sup>).

Die immunologische Analyse des resultierenden Stammes *R. eutropha* HF798 zeigte, dass die MBH- und RH-Untereinheiten HoxG und HoxC fehlen, wohingegen die HoxH-Untereinheit der SH wieder produziert wurde (Abbildung 6). Ebenso wurde die katalytische Aktivität der SH wiederhergestellt (Abbildung S1, Tabelle 3). Die wasserstoffabhängige NAD<sup>+</sup>-Reduktionsaktivität der SH lag in derselben Größenordnung wie die des Wildtyps H16 (Tabelle 3).

**Tabelle 3: SH-Aktivitäten in mit CTAB behandelten Zellen und löslichen Extrakten von unterschiedlichen *R. eutropha*-Derivaten.**

Stamm	Genotyp	Phänotyp	H <sub>2</sub> : NAD <sup>+</sup> [ U x mg <sup>-1</sup> ] <sup>a</sup>	
			lösliche Fraktion	CTAB-behandelte Zellen
HF500	$\Delta hoxH, \Delta hoxG, \Delta hoxC$	SH <sup>-</sup> , MBH <sup>-</sup> , RH <sup>-</sup>	<0,001	<0,001
H16	Wildtyp	SH <sup>+</sup> , MBH <sup>+</sup> , RH <sup>+</sup>	6,9 ± 1,7	3,5 ± 1,0
HF798	$\Delta hoxG, \Delta hoxC$	SH <sup>+</sup> , MBH <sup>-</sup> , RH <sup>-</sup>	11,4 ± 3,9	3,2 ± 0,9

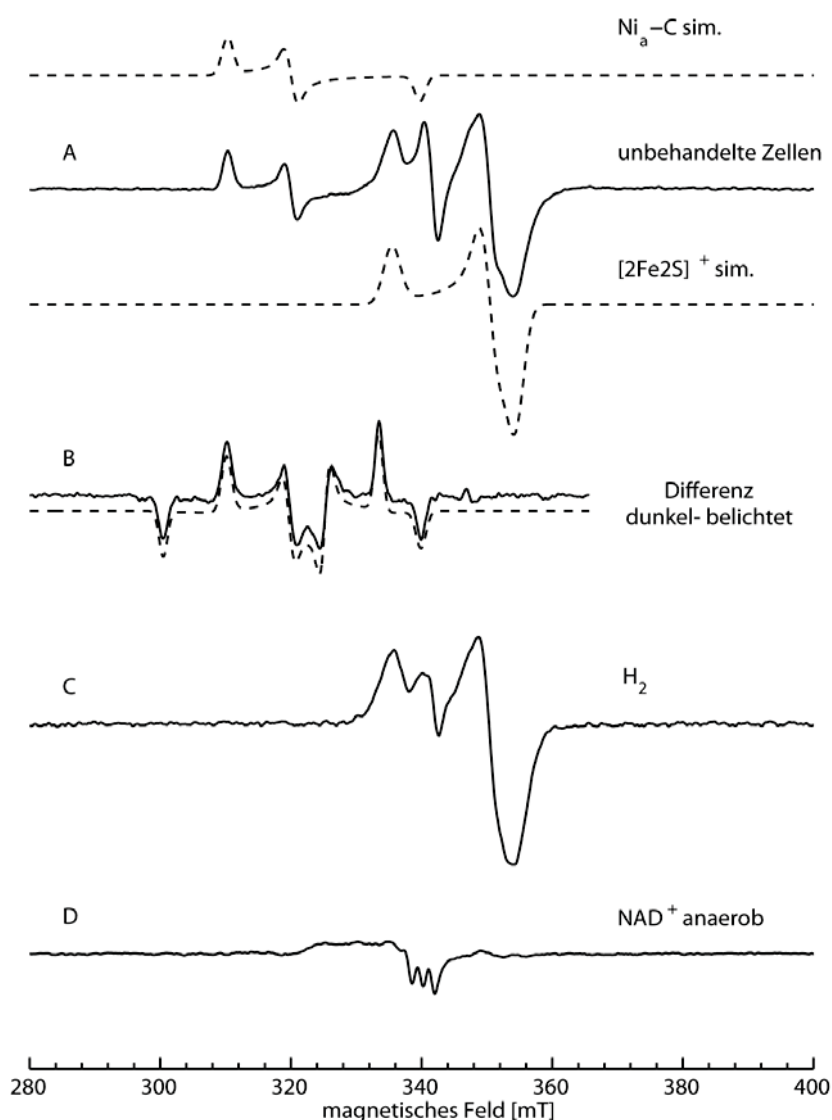
<sup>a</sup> Die Stämme wurden in FGN-Medium angezogen und die Aktivität der löslichen Hydrogenase - wie in "Material und Methoden" beschrieben - gemessen. Die Werte repräsentieren das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

### 3.1.2 In-situ-EPR-Spektroskopie der SH

Für die Untersuchung der paramagnetischen Kofaktoren in der SH wurden EPR-spektroskopische Experimente von Dr. Miguel Saggu und Dr. Friedhelm Lenzian in der Gruppe von Prof. Dr. Peter Hildebrandt am Max-Volmer-Institut für Biophysikalische Chemie der Technischen Universität Berlin durchgeführt. Die EPR-Spektroskopie erlaubt die Identifizierung und Charakterisierung von paramagnetischen Spezies und beruht auf der Messung von Energiedifferenzen bei der Wechselwirkung ungepaarter Elektronen mit einem von außen angelegten Magnetfeld. Bei paramagnetischen Metallzentren kann man drei g-

Komponenten ( $g_x$ ,  $g_y$  und  $g_z$ ) detektieren, die einen spezifischen Fingerabdruck des jeweiligen Elements, dessen Redoxzustand und elektronischer Struktur darstellen (Lubitz *et al.* 2007).

Unbehandelte Zellen wiesen im niederen Feldbereich starke Ni-Signale mit gut aufgelösten  $g_x$ - und  $g_y$ -Komponenten auf (Abbildung 7). Die aus Simulationen erhaltenen  $g$ -Werte von 2,20, 2,14 und 2,01 mit einer Linienbreite von 1,8 mT konnten dem  $Ni_a$ -C-Redoxzustand zugeordnet werden, der durch ein Hydrid in der Brückenposition zwischen Nickel und Eisen im aktiven Zentrum charakterisiert ist und auch in „Standard“-[NiFe]-Hydrogenasen gefunden wird (Foerster *et al.* 2005). Zusätzlich wurden auch die Signale eines  $[2Fe2S]^+$ -Clusters und für FMN-Radikale ( $g = 2,00$ ) detektiert.



**Abb. 7:** *In-situ*-EPR-Spektren der SH (durchgezogene Linien) sowie dazugehörige Simulationen (gestrichelte Linien). **A:** „Frisch“ geerntete Zellen **B:** Differenz zwischen dunkel-adaptierten und belichteten Zellen **C:** frisch geerntete Zellen, die mit  $H_2$  inkubiert wurden. **D:** CTAB-behandelte Zellen, die anaerob mit  $NAD^+$  oxidiert wurden. Alle Spektren wurden bei 35 K aufgenommen.

Eine relative Spinquantifizierung basierend auf dem Vergleich zwischen der doppeltintegrierten Simulation von  $Ni_a$ -C und dem quantitativ reduzierten  $[2Fe2S]^+$ -Cluster

ergab einen Ni<sub>a</sub>-C-Gehalt von ca. 60 % in frisch geernteten Zellen. Wie in „Standard“-Hydrogenasen wird der Ni<sub>a</sub>-C-Zustand der SH durch 30-minütige Weißlichtbestrahlung bei T = 80 K vollständig in den Ni-L-Zustand umgewandelt, der durch ein vom [NiFe]-Zentrum dissoziiertes Proton gekennzeichnet ist (Brecht *et al.* 2003). Nach einer 10-minütigen Dunkeladaptation bei T > 100 K wurde Ni-L vollständig zu Ni<sub>a</sub>-C rücktransformiert. Die Simulation des Differenzspektrums liefert für den Ni-L-Zustand g-Werte von 2,27, 2,10 und 2,05 mit einer Linienbreite von 1,5 mT (Abbildung 7B).

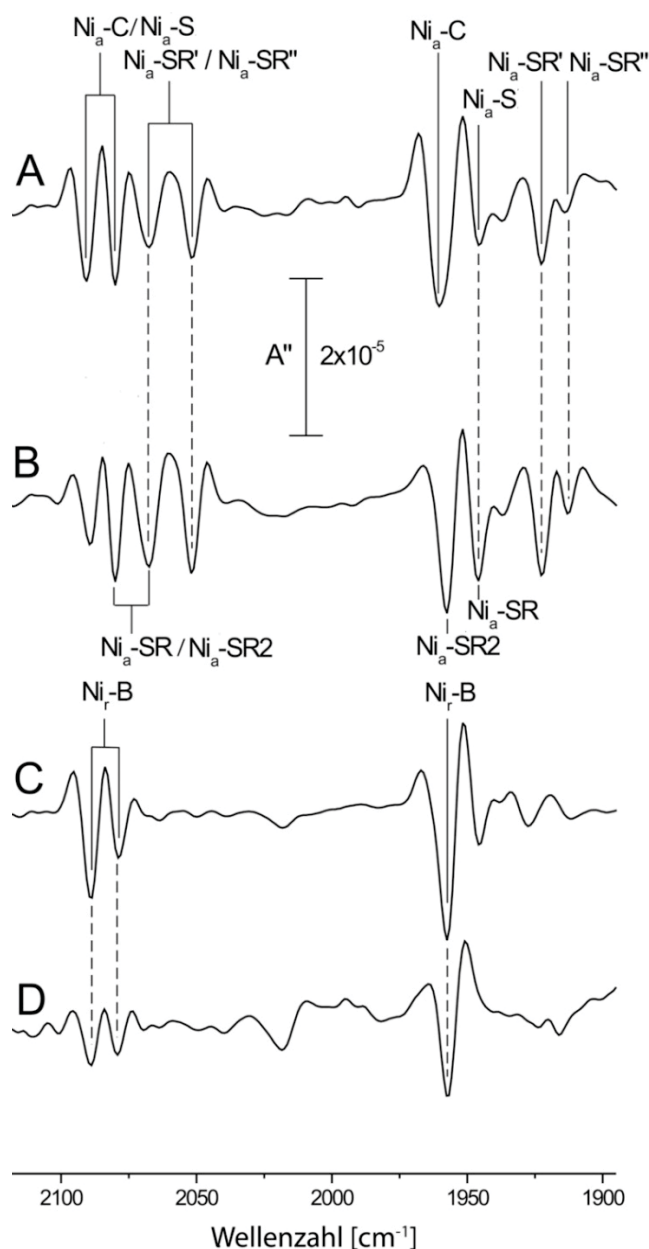
Um die absolute SH-Aktivität in vollständigen Zellen zu bestimmen, wurde eine EPR-basierte Spin-Quantifizierung des SH-eigenen [2Fe2S]-Clusters durchgeführt, wobei CuSO<sub>4</sub> als Standard benutzt wurde. Nach Subtraktion des [2Fe2S]-Cluster-Signals des SH-, MBH- und RH-negativen Stammes HF500 betrug die Konzentration des Spin-Signals des [2Fe2S]-Clusters der SH ca. 15 µM. Unter Berücksichtigung des Molekulargewichts der nativen SH von 205 kDa ergibt sich daraus eine SH-Konzentration von 3,1 mg/ml. Auf der Basis der spezifischen Aktivität von 3,2 U/mg (Tabelle 3) lässt sich daraus eine absolute SH-Aktivität von ca. 185 U/mg errechnen, die gut mit der Aktivität gereinigter SH korreliert (van der Linden *et al.* 2006).

Eine 30-minütige Inkubation mit H<sub>2</sub> führte zu dem Verschwinden der Ni<sub>a</sub>-C-Signale (Abbildung 7C), während die Signale für FMN und den [2Fe2S]<sup>+</sup>-Cluster bestehen blieben. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das aktive Zentrum weiter zu den auch in „Standard“-[NiFe]-Hydrogenasen gefundenen Ni<sub>a</sub>-SR-Zuständen reduziert wird. Des Weiteren führte die Oxidation von SH-haltigen Zellen, die sich nach Permeabilisierung durch CTAB-Behandlung und anschließender Inkubation mit einem Überschuss an NAD<sup>+</sup> unter anaeroben Bedingungen einstellte, zum Verschwinden sämtlicher Nickel- und [FeS]-bezogenen EPR-Signale (Abbildung 7D). Es waren lediglich Hintergrundsignale einer unbekannten, zellulären paramagnetischen Spezies sichtbar. Das Signal besitzt Ähnlichkeit zu solchen, die auf einem Stickstoff-Liganden am Eisen basieren, wie z. B. in der Prostaglandin-H-Synthase (Karthain *et al.* 1987). EPR-Signale, die den oxidierten Ni(III)-Spezies Ni<sub>u</sub>-A oder Ni<sub>r</sub>-B zuzuordnen sind, konnten in der SH bislang nicht identifiziert werden.

### 3.1.3 In-situ-FTIR-Spektroskopie der SH

Für eine Untersuchung der Redoxzustände des [NiFe]-Zentrums ist EPR-Spektroskopie alleine nicht ausreichend, da nur paramagnetische Zustände des Nickels detektierbar sind. Daher wurde zusätzlich zu der EPR- auch Infrarot-Spektroskopie in Zusammenarbeit mit Marius Horch und Dr. Ingo Zebger (AG Prof. Dr. P. Hildebrandt, Max-Volmer-Institut für Biophysikalische Chemie der Technischen Universität Berlin) durchgeführt.

Die Infrarot-Spektroskopie beruht auf der Anregung von Molekülschwingungen durch die Absorption von Infrarotstrahlung. Änderungen der Elektronendichte am katalytischen Zentrum der [NiFe]-Hydrogenasen, einschließlich Modifikationen in der Ligandensphäre können anhand der resultierenden Verschiebungen der absoluten Position von den Absorptionsbanden der CO- und CN-Liganden des Eisen verfolgt werden.



**Abb. 8: *In situ*-FTIR Untersuchungen (zweite Ableitung) des [NiFe]-Zentrums der nativen SH.** A: "frisch" geerntete Zellen. B: nach 30 min Inkubation mit 1 bar H<sub>2</sub>. C: anaerobe Oxidation mit NAD<sup>+</sup> und D: nach aerobe Oxidation.

So spiegelt beispielsweise eine Verschiebung der Streckschwingungen zu höheren Wellenzahlen eine Erniedrigung der Elektronendichte des aktiven Zentrums wider (Darensbourg *et al.* 2000). Dabei sind die Banden im Spektralbereich von 2100-2040 cm<sup>-1</sup> alle durch CN-Liganden hervorgerufen, während Banden zwischen 1980-1900 cm<sup>-1</sup> auf den CO-



Liganden in [NiFe]-Hydrogenasen zurückzuführen sind (Happe *et al.* 1997; Pierik *et al.* 1999; De Lacey *et al.* 2007).

Da die Untersuchungen in ganzen Zellen durchgeführt wurden, waren die CO- und CN-Bandenintensitäten in den FTIR-Spektren relativ gering und wurden von einer stark modulierten Basislinie überlagert (Abbildung S2). Um eine zuverlässige Bandenzuordnung zu gewährleisten, wurde die zweite Ableitung der Spektren berechnet, in der Absorptionsbanden durch negative Peaks gekennzeichnet sind. Die FTIR-Spektren der unterschiedlich behandelten *R. eutropha*-Zellen sind in Abbildung 8 gezeigt. In frisch geernteten *R. eutropha*-Zellen dominierte eine CO-Absorption bei  $1961\text{ cm}^{-1}$ . Die zugehörigen CN-Streckschwingungsbanden lagen bei  $2080$  und  $2091\text{ cm}^{-1}$  (Abbildung 8A). In Übereinstimmung mit der EPR-Spinquantifizierung wurden diese Banden dem  $\text{Ni}_a\text{-C}$ -Zustand der SH zugeordnet. Die dem  $\text{Ni}_a\text{-C}$  zugeordneten Streckschwingungen sind im Vergleich zu früheren Untersuchungen am isolierten Enzym bei kryogenen Temperaturen um  $2\text{-}5\text{ cm}^{-1}$  zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben (van der Linden *et al.* 2006).

Diese Abweichungen könnten auf unterschiedliche pH-Werte im Cytoplasma und im Puffer des gereinigten Enzyms oder durch temperaturabhängige Änderungen im Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk beruhen (Fichtner *et al.* 2006; De Lacey *et al.* 2007). Des Weiteren waren niederfrequente Absorptionsbanden der CO- bzw. CN-Streckschwingungen bei  $1913$ ,  $1922$ ,  $2052$  und  $2068\text{ cm}^{-1}$  zu beobachten. Die beiden letzteren Banden waren aufgrund der Überlappung von benachbarten Absorptionen verbreitert. Nach Inkubation mit  $1\text{ bar H}_2$  verstärkte sich die Intensität dieser Banden signifikant (Spektrum 8B), so dass diese den reduzierten Spezies  $\text{Ni}_a\text{-SR}'$  und  $\text{Ni}_a\text{-SR}''$  zugeordnet werden konnten. Die Banden bei  $1946$ ,  $2069$  und  $2080\text{ cm}^{-1}$  repräsentieren den  $\text{Ni}_a\text{-SR}$ -Zustand. Die Zuordnung der reduzierten Redoxzustände wurde durch die zuvor ermittelten spektroelektrochemischen FTIR-Daten der gereinigten SH gestützt, die unter reduktiven Bedingungen bei  $-391\text{ mV vs. SHE}$  aufgenommen wurden (van der Linden *et al.* 2006). Zudem wurden spektroskopische Studien der cyanobakteriellen SH von *Synechocystis sp.* PCC 6803, der MBH aus *R. eutropha*, sowie *D. vulgaris* Miyazaki F für die Zuordnung aller Redoxzustände verwendet (Tabelle 7; Germer *et al.* 2009; Ludwig *et al.* 2009; Millo *et al.* 2009). Die Banden bei  $1958$ ,  $2068$  und  $2080\text{ cm}^{-1}$  repräsentieren eine weitere reduzierte, nicht EPR-aktive  $\text{Ni}_a\text{-SR}_2$ -Spezies, die bereits in der gereinigten bidirektionalen Hydrogenase aus *Synechocystis* gefunden wurde (Germer *et al.* 2009). Dabei ist die Reduktion mit  $\text{H}_2$  reversibel. Nach Begasung mit Stickstoff nahm die Intensität der verschiedenen  $\text{Ni}_a\text{-SR}$ -Banden wieder ab und  $\text{Ni}_a\text{-C}$  prägte sich wieder aus (Abbildung S3). Die Inkubation der

CTAB-behandelten Zellen mit  $\text{NAD}^+$  unter anaeroben Bedingungen (Abbildung 8C) oder mit Luft (Abbildung 8D) führte zu drei Banden bei 1957, 2079 und  $2089\text{ cm}^{-1}$ . In Übereinstimmung mit Daten, die kürzlich für die bidirektionale Hydrogenase von *Synechocystis sp.* ermittelt wurden, können diese Banden einem "Ni<sub>2</sub>-B-artigen"-Zustand zugeordnet werden, der allerdings nicht EPR-aktiv ist. Zwei weitere Behandlungen führten ebenfalls zur Bildung des Ni<sub>2</sub>-B-artigen Redoxspezies. Dies war zum einen die aerobe Permeabilisierung der Zellen durch drei aufeinanderfolgende Einfrier-Auftau-Zyklen ohne Zusatz von Detergenzien. Dabei war es möglich, das oxidierte Enzym durch  $\text{H}_2$ -Inkubation wieder zu reduzieren, so dass die katalytisch aktiven Zustände wiederhergestellt wurden (Abbildung S4). Zum anderen konnte für lithoautotroph gewachsene Zellen ein komplett reversibles Redoxverhalten der SH infolge des Wechsels von einer Inertgas- zu einer oxidierenden Atmosphäre und *vice versa* nachgewiesen werden (Abbildung S5).

Die vorliegende *in-situ*-Studie belegt, dass das aktive Zentrum der SH einen „Standardsatz“ anorganischer Liganden, d. h. zwei  $\text{CN}^-$ - und einen CO-Liganden enthält. Dies widerspricht früheren Studien an der gereinigten SH, bei denen zwei zusätzliche Cyanide am aktiven Zentrum postuliert wurden, die für die Sauerstofftoleranz der SH wichtig sein sollten (Happe *et al.* 2000; Van der Linden *et al.* 2004; Burgdorf *et al.* 2005).

### 3.2 Überproduktion und Reinigung nativer SH

Für weitere spektroskopische Untersuchungen und den Einsatz in der Kofaktorregenerierung war es erforderlich, größere Mengen möglichst aktiver und homogener SH zu produzieren und zu reinigen. Dafür sollte ein einfaches und schnelles Überexpressionssystem etabliert und die SH zur Homogenität gereinigt werden.

#### 3.2.1 Ein Expressionsplasmid für die SH-Produktion

Für die SH-Produktion wurde ein Plasmid verwendet, das die Gene *hoxFUYHWHypA2B2F2CDEXhoxABCJ* unter der Kontrolle des nativen SH-Promotors trägt. Um nur einen Minimalsatz von Genen für die SH-Expression einzusetzen, wurden die Gene *hoxBCJ* deletiert, die die regulatorische Hydrogenase sowie die Histidin-Protein-Kinase kodieren. Eine den *Strep*-tag II codierende Sequenz wurde stromaufwärts des *hoxF*-Gens eingefügt, um eine schnelle, einstufige Reinigung mittels Affinitätschromatographie zu gewährleisten. Das daraus hervorgegangene Plasmid pGE760 (Abbildung 5) wurde in den Stamm *R. eutropha* HF210, dem das Megaplasmid pHG1 mit allen bekannten Hydrogenasegenen fehlt, konjugativ übertragen. Um die resultierende Transkonjugante *R. eutropha* HF210(pGE760) mit dem Wildtyp *R. eutropha* H16 zu vergleichen, wurden beide Stämme heterotroph unter Hydrogenase-dereprimierenden Bedingungen in Fruktose-

Glycerin-Minimalmedium (FGN) in einem Schikanenkolben mit 20 % Füllhöhe kultiviert. Die wasserstoffabhängige,  $\text{NAD}^+$ -reduzierende Aktivität im löslichen Extrakt von *R. eutropha* HF210(pGE760) betrug  $10,63 \pm 0,38$  U/mg und war im Vergleich zum Wildtyp ( $6,93 \pm 1,0$  U/mg) um den Faktor 1,5 höher. Aufgrund der hohen SH-Aktivität wurde der Stamm *R. eutropha* HF210(pGE760) für die SH-Produktion eingesetzt.

### 3.2.2 Mikroaerobe Zellkultivierung für die SH-Überproduktion

Mikroaerobe Anzuchtbedingungen hatten bereits für die MBH gezeigt, dass ein niedriger Sauerstoffpartialdruck ( $\text{pO}_2$ ) zu einer deutlich höheren MBH-Aktivität in der Membran führt (Goris *et al.* 2011). Analog zur MBH-Überproduktion wurden daher für die SH-Synthese ein 5 l-Schikanekolben verwendet, der zu 80 % mit Medium gefüllt war. Bei dem Medium handelte es sich um ein Fruktose-Glycerin-Minimalmedium-Medium mit reduzierter Fruktosekonzentration (0,05 % w/v, FGN\*) und erhöhter Glycerinkonzentration (0,4 % v/v). Nach sieben Tagen Anzucht von *R. eutropha* HF210(pGE760) wurde die  $\text{OD}_{600}$  von  $9 \pm 1$  erreicht und es konnten SH-Aktivitäten von  $17,00 \pm 1,73$  U/ mg im löslichen Extrakt festgestellt werden. Dies übertraf die SH-Aktivität von  $10,49 \pm 1,13$  U/ mg nach Kultivierungen in Standard-FGN-Medium (20 % Füllhöhe in Schikanekolben) um den Faktor 1,6. Für die folgenden Untersuchungen wurde *R. eutropha* generell unter den oben genannten Bedingungen (mikroaerob in FGN\*-Medium) kultiviert, um eine große Menge aktives SH-Enzym zu erlangen.

### 3.2.3 Ein optimiertes Protokoll für die Reinigung der SH

In früheren Arbeiten wurde die SH stets in klassischen, mehrstufigen und mehrtägigen Reinigungsschritten angereichert, die aufwändige Pufferaustausche sowie mehrere chromatographische Schritte beinhalteten (Schneider und Schlegel 1976; van der Linden *et al.* 2006). In Zusammenarbeit mit Juliane Ratzka am Institut für Chemie/Enzymtechnologie (AG Prof. Dr. Marion Ansorge-Schumacher) der Technischen Universität Berlin konnte ein stabilisierender Effekt von Glycerin (5 % v/v) und neutralem pH 7,0 auf die Aktivität gereinigter SH festgestellt werden (Ratzka *et al.* 2011). Der SH-Reinigungspuffer wurde dementsprechend angepasst. In der Vergangenheit hatte die anaerobe Oxidation der SH mit  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  während der Proteinreinigung bereits zu erhöhter Aktivität geführt (van der Linden *et al.* 2006). Allerdings führt  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  zu einer starken Erniedrigung der Bindekapazität der *Strep*-Tactin-Matrix und wurde in der vorliegenden Arbeit durch  $\text{NAD}^+$  ersetzt, da es den physiologischen Elektronenakzeptor der SH darstellt. Die Reinigung der SH erfolgte aus löslichem Extrakt von mikroaerob angezogenen *R. eutropha*-Zellen mittels einer

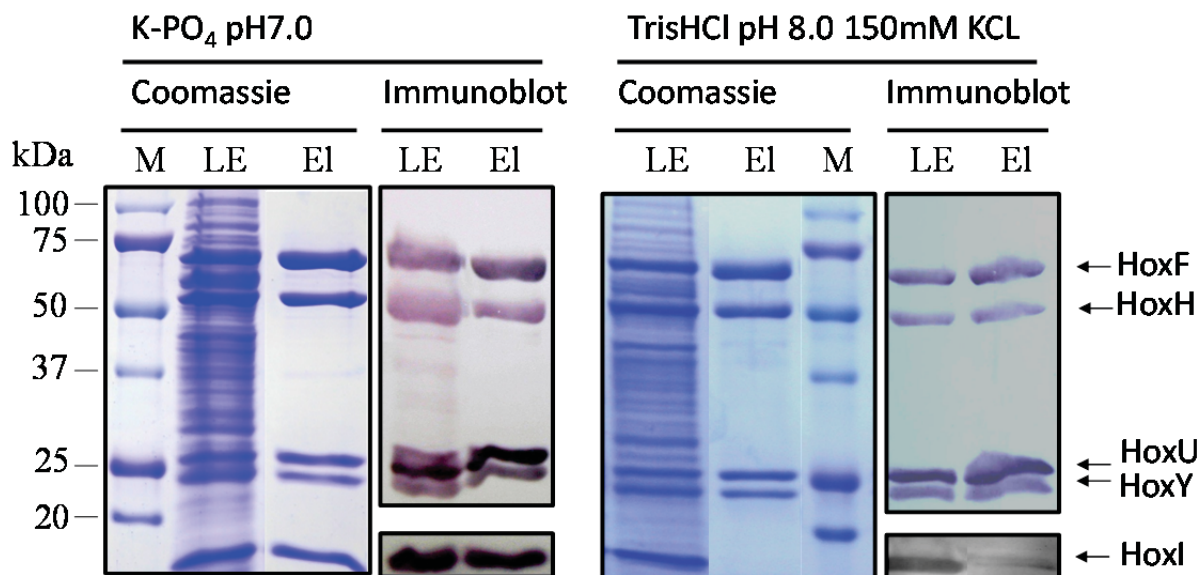
schnellen, einstufigen Affinitätschromatographie in einem Puffer, der 50 mM K-PO<sub>4</sub>, pH 7,0, 5 mM NAD<sup>+</sup>, und 5 % (v/v) Glycerin enthielt (weitere Details der Reinigung in Kapitel 2.3). Nach anschließendem Auswaschen des NAD<sup>+</sup> mit demselben Puffer ohne NAD<sup>+</sup> wurde die SH mittels Ultrafiltration konzentriert.

**Tabelle 4: Repräsentatives Beispiel für die Reinigung der SH aus *R. eutropha* HF210(pGE760).**

	Volumen	Protein	Gesamt-protein	Spezifische Aktivität	Gesamt-aktivität	Anreicherungs-faktor	Ausbeute
	[ml]	[mg/ml]	[mg]	[U/mg]*	[U]*		[%]
Zellpellet	12,0	200	2400,0	7,9 ± 0,62	18960 ± 1440	1	100
Löslicher Extrakt	25,0	29,5	737,5	17,0 ± 1,73	12540 ± 1280	2,2	66,1
Nach Affinitäts-chromatographie	50,0	1,3	65,0	137,0 ± 15,0	8910 ± 980	17,3	46,9

\*Die Aktivität wurde mittels H<sub>2</sub>-abhängiger NAD<sup>+</sup>-Reduktion in einem anaeroben Test bestimmt. 1 U entspricht dem Umsatz von 1 µmol H<sub>2</sub> x min<sup>-1</sup>. Ein Kulturvolumen von 4 l mit einer OD<sub>436</sub> von 9 enthielt ca. 18 g Zellen (Nassgewicht), von denen 12 g für die Reinigung verwendet wurden.

Die mit dem neuen Protokoll gereinigte SH besaß eine H<sub>2</sub>-abhängige NAD<sup>+</sup>-Reduktionsaktivität von durchschnittlich 137,0 ± 15,0 U/ mg (Tabelle 4), wobei selbst nach Konzentrieren der Proben durch Ultrafiltration bis auf eine Konzentration von etwa 1 mM (ca. 205 mg/ml) und anschließender Verdünnung kein Aktivitätsverlust festgestellt



**Abb. 9: Anreicherung der SH.** SH-Protein wurde aus dem löslichen Extrakt von *R. eutropha* HF210(pGE760) über *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie gereinigt. Proteine im löslichen Extrakt (LE jeweils 20 µg) und im Eluat nach Affinitätschromatographie (El, jeweils 5 µg) wurden in 12 %-igen SDS-PAGE-Gelen getrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt bzw. mittels Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen HoxFUHYI sichtbar gemacht. Die Positionen und Molekulmassen der Markerproteine (Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standards Dual Color, Bio-Rad) sind angegeben.

wurde. Die fünf Proteinbanden in Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gelen mit den molekularen Massen von 71, 60, 27, 23, 18 kDa konnten mittels immunologischer Analyse eindeutig den fünf Untereinheiten der SH zugeordnet werden (Abbildung 9). Eine visuelle

Äbschätzung der Proteinbandenstärke ergab eine Reinheit des Enzyms von mehr als 95 %. Aus einer 4-l-Anzucht konnten so hochgerechnet knapp 100 mg heterohexamerer SH (HoxFUYHI<sub>2</sub>) gereinigt werden (siehe Tabelle 4). Wurde während der Reinigung ein Puffersystem mit leicht alkalischem pH und höherer Ionenstärke (150 mM KCl 50 mM TrisHCl pH 8,0) eingesetzt, führte dies zu einer Dissoziation des HoxI-Homodimers aus dem SH-Komplex (Abbildung 9), so wie es in der Literatur beschrieben ist (Burgdorf *et al.* 2005). Die heterotetramere SH (HoxFUYH) besaß eine Aktivität von 123,1 U/mg nach der Anreicherung. Für die nachfolgenden Experimente wurde die heterohexamere SH eingesetzt, falls nicht anderweitig beschrieben.

### 3.2.4 Größenbestimmung der nativen SH

Zur Größenbestimmung wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Frisch gereinigte SH eluierte in einem einzigen Peak. Im Vergleich mit Standardproteinen wurde eine molekulare Masse von  $414 \pm 44$  kDa berechnet, die einem Dimer bestehend aus zwei heterohexameren SH-Einheiten entspricht. Reduktionsmittel wie DTT führten zu keiner Monomerbildung. Jedoch führte das Einfrieren bei -80 °C, mehrmonatiges Lagern und Auftauen der Proben zu einem Monomeranteil ( $205 \pm 21$  kDa) von 25-20 % des Gesamtproteins. Im Weiteren wird für molekulare Konzentrationsangaben die berechnete molekulare Masse eines Monomers von 205 kDa angenommen, um die Anzahl der Kofaktoren pro SH-Einheit zu bestimmen.

Das hier beschriebene Reinigungsprotokoll erlaubte die Reinigung hochaktiver dimerer SH in großen Mengen für die Analyse der Kofaktoren und Kristallisationsversuche.

### 3.2.5 Versuche zur Strukturaufklärung der SH

Um die Struktur der SH aufzuklären, wurden Kristallisationsversuche von Dr. Hideaki Ogata am Max-Planck-Institut für chemische Energiekonversion, Mülheim, durchgeführt. Um das Elutionsmittel Desthiobiotin aus dem Elutionspuffer nach der Affinitätschromatographie zu entfernen und die Reinheit weiter zu verbessern, wurde eine Größenausschlusschromatographie in SH-Lagerungspuffer (5 % Glycerin, 50 mM K-PO<sub>4</sub>, pH 7,0) nachgeschaltet und die gereinigte SH anschließend mittels Ultrafiltration auf eine Proteinkonzentration von 20-100 mg/ml gebracht. Zuvor wurde bereits gezeigt, dass (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> die Stabilität und FMN die Aktivität der SH erhöht (Ratzka *et al.* 2011), (Schneider und Schlegel 1978), daher wurde auch nach einigen Reinigungen dem SH-Lagerungspuffer 50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 mM FMN und zusätzlich Reduktionsmittel wie 5 mM DTT oder 1 mM TCEP hinzugefügt. Kristallisationsversuche wurden auch mit Präparationen

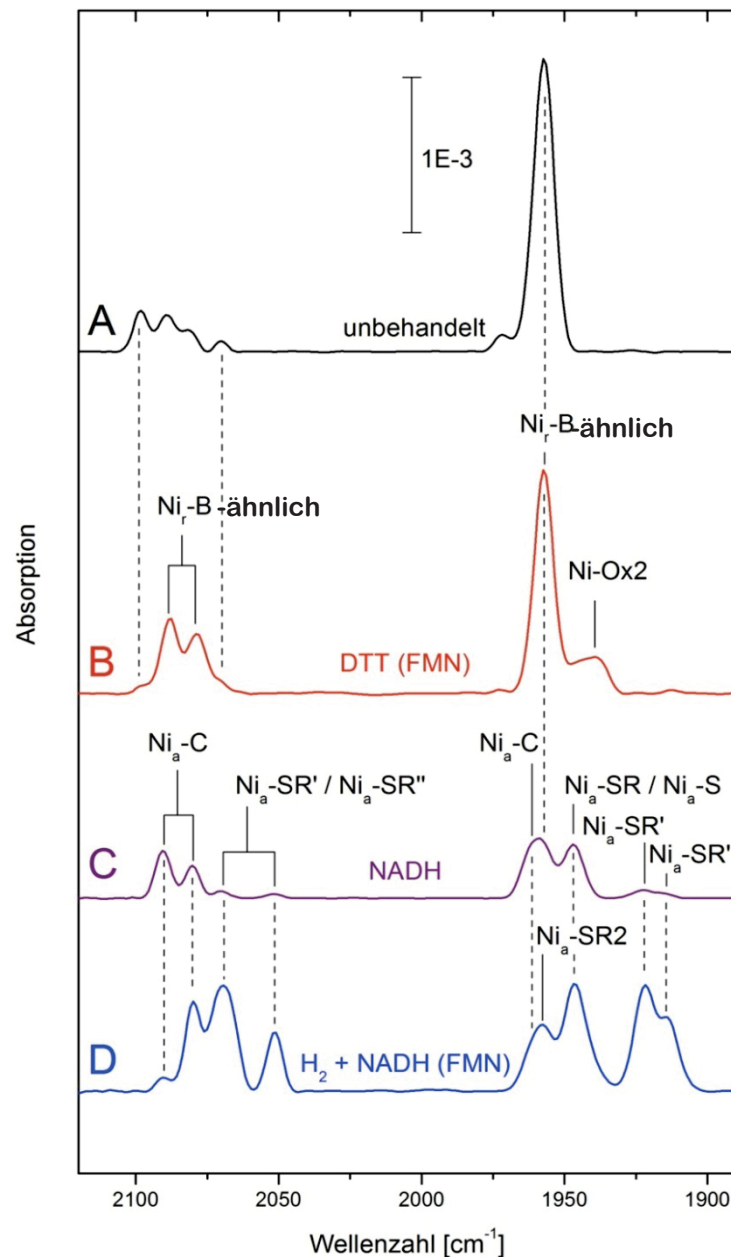


heterotetramerer SH-Präparationen durchgeführt. Insgesamt wurden über 500 Kristallisationsbedingungen mit der „sitting drop“- bzw. „counter-diffusion“-Methode ausgetestet (Stevens 2000). Aggregate und kristallähnliche Strukturen wurden in einigen Ansätzen festgestellt, allerdings streuten diese im Röntgenstrahl bislang nicht.

### 3.2.6 Redoxverhalten des [NiFe]-Zentrums

Um das Redoxverhalten des aktiven Zentrums der SH zu untersuchen, wurden die SH-Präparationen mittels FTIR-Spektroskopie durch Marius Horch am Max-Volmer-Laboratorium für Biophysikalische Chemie an der Technischen Universität Berlin untersucht. Die unbehandelte SH zeigte einen großen Peak bei  $1956\text{ cm}^{-1}$  und einen Satz von vier schwachen Banden bei 2098, 2088, 2081 und  $2071\text{ cm}^{-1}$  (Abbildung 10). Dieses Muster wurde schon zuvor für die oxidierte SH beschrieben (Happe *et al.* 2000). Dabei war die Bande in der CN-Region bei  $2098\text{ cm}^{-1}$  am intensivsten.

Nach anaerober Reduktion der präparierten SH mit 5 mM DTT und 1 mM FMN nahmen die Intensitäten der hoch- und niederfrequenten CN-Banden ab, während die Bandenintensitäten bei 2089 und  $2079\text{ cm}^{-1}$  zunahmen und bei  $1938\text{ cm}^{-1}$  eine kleine Schulter auftrat (Abbildung 10B). Die CO-Bande bei  $1956\text{ cm}^{-1}$  blieb weitestgehend konstant. Dadurch war nahezu ein Reinzustand mit nur zwei CN-Banden erkennbar, der bereits in *R. eutropha*-Zellen durch *in situ*-Spektroskopie detektiert wurde (Kapitel 3.1.3). Aufgrund der Bandenpositionen ist er vergleichbar zum  $\text{Ni}_I\text{-B}$ -Zustand der Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F (Millo *et al.* 2009). Nach Reduktion der unbehandelten Probe mit dem physiologischen Elektronendonator NADH (1 mM) traten bei 1946, 1922 und  $1914\text{ cm}^{-1}$  mehrere Banden im CO-Bereich auf (Abbildung 10C), die auch in vorhergehenden spektro-elektrochemischen Experimenten beobachtet wurden (van der Linden *et al.* 2006). Eine breite Bande bei  $1959\text{ cm}^{-1}$  hingegen deutet auf eine Überlappung zweier Einzelbanden hin (Abbildung 9C). Die Behandlung der SH mit Wasserstoff in Anwesenheit von NADH und FMN führte zu einer Intensivitätserhöhung der drei niederfrequenten Streckschwingungen des CO-Liganden ( $1946$ ,  $1921$ ,  $1914\text{ cm}^{-1}$ ) sowie der Banden bei 2079, 2069 und  $2051\text{ cm}^{-1}$  (Abbildung 10D). Die breite Bande bei  $1959\text{ cm}^{-1}$  verschob sich um eine Wellenzahl auf  $1958\text{ cm}^{-1}$ . Vermutlich überlagerte eine zweite Bande mit einer Wellenzahl von ungefähr von  $1961\text{ cm}^{-1}$  die Bande bei  $1958\text{ cm}^{-1}$ , was zu einer breiten Bande mit einem Maximum von  $1959\text{ cm}^{-1}$  führte. Die CO-Streckschwingungen bei 1961, 1946, 1922 und  $1914\text{ cm}^{-1}$  entsprechen den Redoxzuständen  $\text{Ni}_a\text{C}$ ,  $\text{Ni}_a\text{S}/\text{Ni}_a\text{SR}$ ,  $\text{Ni}_a\text{SR}$ , und  $\text{Ni}_a\text{SR}''$  in Standard-[NiFe]-Hydrogenasen (De Lacey *et al.* 2007).



**Abb. 10:** *In vitro*-FTIR-Spektren der SH. **A:** unbehandelte SH direkt nach der Reinigung. **B:** nach Inkubation mit 5 mM DTT und 1 mM FMN. **C:** anaerobe Behandlung mit 1 mM NADH. **D:** 30 min Inkubation mit 1 bar H<sub>2</sub> in Anwesenheit von 1 mM NADH und FMN.

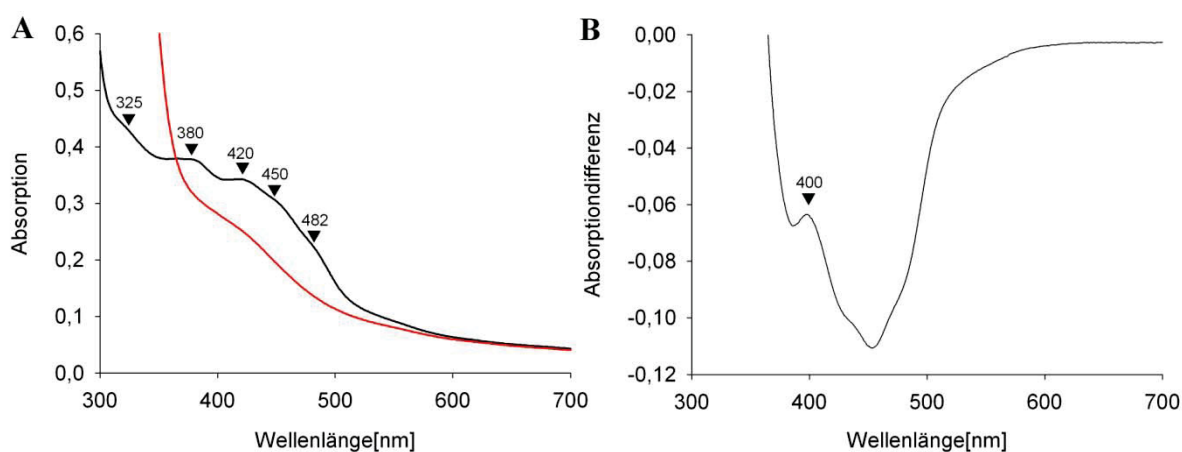
Ferner repräsentiert die Bande bei 1958 cm<sup>-1</sup> vermutlich eine weitere reduzierte Spezies, genannt Ni<sub>a</sub>-SR2. Dieses wurde kürzlich auch in der cyanobakteriellen SH aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 detektiert (Germer *et al.* 2009). Die vorliegende *in vitro*-Studie der nativen SH steht im Einklang mit den *in situ*-Daten (Kapitel 3.1.3) und belegt, dass das aktive Zentrum der SH einen „Standardsatz“ anorganischer Liganden enthält.

### 3.2.7 Analyse der [FeS]-Cluster und FMN in der SH

Neben dem aktiven Zentrum besitzt die SH weitere Kofaktoren, deren genaue Zusammensetzung nicht bekannt ist (Schneider *et al.* 1979; Schneider *et al.* 1984; van der Linden *et al.* 2006). Eine Metallbestimmung mittels Röntgentotalreflexion (TXRF) wurde in



Kooperation mit Dr. Michael Haumann an der Freien Universität Berlin durchgeführt. Diese ergab die Präsenz von Nickel, Eisen, Chrom, Kupfer und Zink in einem Verhältnis von 1: 19,5: 0,1: 0,2: 0,6 in der isolierten SH. Dies steht im Einklang mit den vier erwarteten [4Fe4S]-Clustern, einem [2Fe2S]-Cluster und einem Eisen im [NiFe]-Zentrum, d. h. einer Gesamtmenge von 19 Eisenatomen. Das Vorhandensein von [Fe-S]-Clustern in der SH ist zusätzlich belegt durch eine breite Absorption zwischen 350-500 nm und Schultern bei 325/380 nm und 420/450/482 nm im zugehörigen UV/vis-Absorptionsspektrum (siehe Abbildung 11). Die Absorption war nach Reduktion mit Dithionit weit weniger stark ausgeprägt, wie es typisch für [2Fe-2S]- bzw. [4Fe-4S]-Cluster ist (Ragan *et al.* 1982; Lippard und Berg 1994; Braun *et al.* 1998).



**Abb. 11: UV-Vis-Absorptionsspektroskopie an der SH.** **A:** Spektren wurden aufgenommen für gereinigtes, heterohexamerer SH-Protein (4,8  $\mu\text{M}$ ) (*as isolated*; schwarze Kurve) und nach Reduktion des Proteins mit Dithionit (400  $\mu\text{M}$ ; rote Kurve). **B:** Differenzspektrum aus reduzierter-minus-oxidiertem SH. Die relevanten Absorptionsmaxima sind durch Dreiecke mit jeweiliger Wellenlänge (nm) gekennzeichnet.

Eine Fluoreszenzbestimmung ergab  $1,00 \pm 0,08$  FMN pro heterohexamerem SH-Molekül, obwohl laut Literatur zwei Flavine erwartet wurden (Schneider und Schlegel 1978). Die Gegenwart von FMN zeigte sich ebenfalls im UV-Vis Spektrum nach Reduktion mit Dithionit (Abbildung 11B). Ein schwacher Peak bei 400 nm kam zum Vorschein, der auf die anionische Semichinonradikalform des FMNs hindeutet (Nöll 2008).

### 3.3 Das Hydrogenase-Modul der SH

Um die Untersuchung der SH hinsichtlich ihrer Vielzahl an Kofaktoren zu vereinfachen, sollten Subformen der SH konstruiert und gereinigt werden, die jeweils nur eine begrenzte Anzahl von Kofaktoren beherbergen. Die SH besteht zum einen aus dem Hydrogenase-Modul, HoxHY, welches das [NiFe]-Zentrum, ein vermutetes FMN und einen potentiellen [Fe-S]-Cluster enthält, und zum anderen dem Diaphorase-Modul HoxFU, das eine Serie von [Fe-S]-Clustern, die NAD(H)-Bindestelle und ein FMN enthält. Während die SH aus *R. opacus* bereits beim Fehlen von zweiwertigen Ionen und geringerer Ionenstärke in beide Module dissoziiert (Schneider *et al.* 1984), mussten die entsprechenden Module der *R. eutropha* SH durch genetische Methoden erzeugt werden. Biochemische Untersuchungen, Proteinfilm-Voltammetrie und FTIR-, EPR- und XAS-Spektroskopie beider SH-Module wurden durchgeführt und sollten Fragen zur Sauerstofftoleranz, der Kofaktorzusammensetzung und der katalytischen Präferenz für entweder die  $H^+$ -Reduktion oder die  $H_2$ -Oxidation klären.

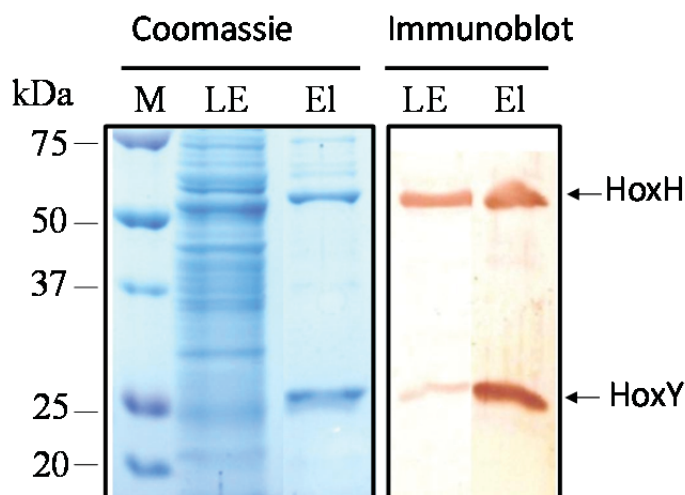
#### 3.3.1 Ein Expressionsplasmid für die Produktion des Hydrogenase-Moduls der SH

Die kleinste enzymatisch aktive Hydrogenase-Subform der *R. eutropha*-SH ist das Hydrogenase-Modul HoxHY. Für die Reinigung dieser Subform wurde ein Plasmid eingesetzt, das ursprünglich die Gene *hoxFUYHWHypA2B2F2CDEX* trug. Ausgehend von diesem Plasmid wurden die Gene *hoxF* und *hoxU*, die für das NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasemodul der SH codieren, deletiert. Zusätzlich wurde das 5' Ende des *hoxY*-Gens mit einer Sequenz versehen, die für das *Strep*-tag II-Peptid codiert. Das Einbringen der resultierenden Plasmide in den *R. eutropha*-Stamm HF210 resultierte in dem Stamm *R. eutropha* HF788 (mit dem Plasmid pHD), der für die folgenden Experimente verwendet wurde (Abbildung 5).

#### 3.3.2 Reinigung des HoxHY-Moduls und dessen katalytische Eigenschaften

Aufgrund des Fehlens des HoxFU-Moduls der SH war *R. eutropha* HF788 unfähig, lithoautotroph zu wachsen. Daher wurde der Stamm heterotroph unter Hydrogenase-dereprimierenden Bedingungen angezogen, was zu einer Synthese des HoxHY-Moduls führte. HoxHY wurde anschließend durch *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie gereinigt. SDS-PAGE in Kombination mit immunologischer Analyse machten zwei Proteinbanden deutlich, die als HoxH und HoxY identifiziert wurden (Abbildung 12). Aus 32 g Zellen (Nassgewicht) wurden routinemäßig 1,2 mg HoxHY mit einem molekularen Gewicht von 67 kDa und einer spezifischen  $H_2$ -Produktionsaktivität von  $11 \pm 1$  U/mg mit reduziertem Methylviologen als

Elektronendonor gewonnen. Es ist anzumerken, dass die Wasserstoffproduktionsaktivität des HoxHY-Moduls weder durch die mikroanerober Anzucht des Stammes *R. eutropha* HF788 in FGN\*-Medium noch durch eine anaerobe Reinigung von HoxHY und Zusatz von FMN während der Reinigung verbessert wurde.



**Abb. 12: Reinigung des HoxHY-Moduls.** Löslicher Extrakt (LE, 20  $\mu$ g) und gereinigtes HoxHY-Protein (EI, 3  $\mu$ g) wurden in einem 12 % SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch getrennt, welches anschließend mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbt bzw. geblottet wurde. Die Untereinheiten wurden immunologisch mit polyklonalen Antikörpern gegen HoxH und HoxY nachgewiesen. Spur M enthielt Markerproteine mit den angegebenen molekularen Massen in kDa.

Auf die Bestimmung des pH-Optimums wurde verzichtet, da das Standardpotential des eingesetzten Dithionits stark pH-abhängig ist (Mayhew 1978). Stattdessen wurden hierfür elektrochemische Methoden eingesetzt (siehe unten). Überraschenderweise wurde für gereinigtes und unbehandeltes HoxHY keine  $H_2$ -oxidierende Aktivität mit den Elektronenakzeptoren FMN, PMS, BV, und MV festgestellt. Dies steht im Gegensatz zu HoxHY aus *R. opacus*, welches in isolierter Form  $H_2$  in Gegenwart von Benzylviologen oder Methylenblau oxidiert (Schneider *et al.* 1984).

**Tabelle 5:  $H_2$ -oxidierende Aktivität von HoxHY unter verschiedenen Bedingungen<sup>a</sup>**

Reaktionsbedingung	$H_2$ -abhängige Reduktion von MV [U x $mg^{-1}$ ]
Ohne Vorinkubation	<0,05
Vorinkubation mit DT	1,02 $\pm$ 0,14
Vorinkubation mit DT und FMN	3,75 $\pm$ 0,49

<sup>a</sup>Details sind im Methodenteil angegeben. Die angegebenen Werte repräsentieren arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Interessanterweise zeigte HoxHY von *R. eutropha*  $H_2$ -oxidierende Aktivität erst nach Vorinkubation mit Dithionit (Tabelle 5). Dies weist darauf hin, dass das unbehandelte HoxHY-Protein zunächst eine reduktive Reaktivierung benötigt. In der nativen SH wird die reduktive Reaktivierung durch das physiologische Reduktionsmittel NADH bewerkstelligt (Schneider und Schlegel 1976). Nach Hinzufügen von FMN zu dem Reaktionsansatz, wurde

ein 3-4-facher Anstieg in der Wasserstoffoxidationsaktivität beobachtet (Tabelle 5). Bezogen auf die molekulare Masse weist das Hydrogenase-Modul eine Wasserstoffproduktions- und Wasserstoffoxidationsaktivität von  $12,2 \pm 1 \text{ s}^{-1}$  bzw.  $4,2 \pm 0,6 \text{ s}^{-1}$  auf. Im Vergleich dazu zeigt die native SH eine vielfach höhere Wasserstoffproduktions- und Wasserstoffoxidationsaktivität von  $128 \pm 35 \text{ s}^{-1}$  bzw.  $326 \pm 19 \text{ s}^{-1}$ . Im Folgenden wurden die Kofaktoren in HoxHY näher untersucht.

### 3.3.3 Analyse der Kofaktoren im Hydrogenase-Modul

Um zu bestimmen, welche Kofaktoren in HoxHY enthalten sind, wurden spektroskopische Untersuchungen mit Metallgehaltbestimmungen und Sequenzvergleichen kombiniert. Die HoxY-Untereinheit aus *R. eutropha* weist eine 49,3 %-ige Aminosäuresequenzähnlichkeit bzw. eine 16,2 %-ige Aminosäuresequenzidentität mit der Untereinheit Nqo6 von

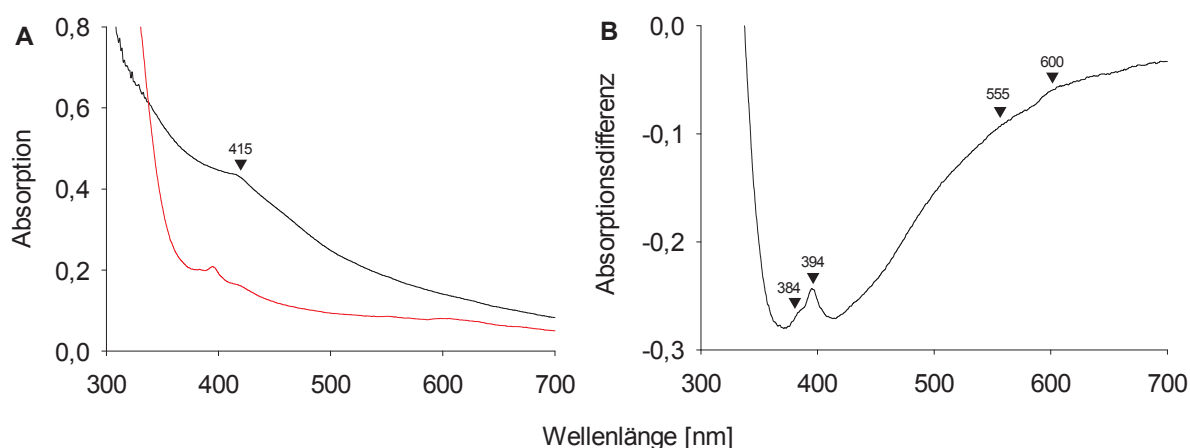
Syncy SH	-----MA-----KIRFATVWLAGCSGCH	18
Synco SH	-----MAQETQQKIRFATIWLACSGCH	23
T.r. Hox1	-----MSTPPKITVATTWLDGCSGCH	21
R.e. SH	----MRAPHKDEIASHELPATPMDPALAANREGKIKVATIGL	45
R.o. SH	----MKHSEKNEIASHELPPTPLDPVLAAGRESKIKVAMIGL	45
T.r. Hox2	-----MAEKPRVATASL	19
T.th. Nqo6	---MALKDLFERDVQELEREGILFTTLEKLVAGRSNSLWPATFGLACA	47
R.e. MBH	-----METKPRTPVLWLHGLE	20
Syncy SH	MSFLDMDEWLIDLAQKVDVVFSPVGSDDLKEYPDNVDVCLVEG--AIANEE	66
Synco SH	MSFLDLDEFLIELIKYVDVVFSPVGSVDKDYKPNVDVCLIEG--AVANQE	71
T.r. Hox1	MSFLDMDERLIELVQQVDIVYSPL-VDTKTLPDHVDVGILEG--SISSED	68
R.e. SH	LSFLDMDERLLPLLEKVTLLRSSL-TDIKRIPERCAIGFVEG--GVSSEE	92
R.o. SH	LSFLDMDERLLVLLDKVTLLHRSSL-SDIKRITERCAIGFIEG--GVANEE	92
T.r. Hox2	MSLLDIDERILQLVDLVTFRDRTPL-TDIK-TLGD	65
T.th. Nqo6	IEMMASTDARNDLARFGSEVFR-ASPR-----QADVMIVAGRLSKKMAP	90
R.e. MBH	ESFIRSAHPLAKDVVLSMISLDYDDTLMAAAGHQAEAILLEEIMTKYKGNV	74
Syncy SH	NLELALQLRQKTKVVISFGDCAVTANVPGMRNMLKGSDFVLRRAIYELGD	116
Synco SH	NLELLEKVRQNTKLLIAFGDCAVTTNVTGIRNQKGDAQTILERGYKELTE	121
T.r. Hox1	DLEKAHAFRKHCKILVSLGDCAVNGNVPAMRNHFKLAD-VVDRAIRDT--	115
R.e. SH	NIETLEHFRENCDILISVGACAVWGGVPAMRNVFELKDCLAAYVNSATA	142
R.o. SH	NIETLEHYRENCVLIISVGACAVWGGVPAMRNVFELKDCLESEYIDSATS	142
T.r. Hox2	NVEVLREFRRCKTLVAVGACAVNGGIPAMRNQFSLAELRESYCD---G	112
T.th. Nqo6	VMRRVWEQMPDPKWVISMGACASSGGMFN-----	119
R.e. MBH	FIEQLKYVAKDAKAIISWGS	130
Syncy SH	GT--PQLPDEPGIVPPLLDKVIPLHEVIPVDIFMPGCPPDAHRIRATLEP	164
Synco SH	EHRLPQQITG-GILPPLLPRVLPIHEVVDIDLFLPGCPPDADRIKAAIAP	170
T.r. Hox1	VTFPQPTPTQ--GVPALLAVVKPIHGVGVDFVPGCPPSADAIWYVLSE	163
R.e. SH	VPGAKAVVPFHPDIPRITTKVYPCHEVVKMDYFIPGCPPDGDALFKVLDD	192
R.o. SH	VPGAKPVVPFHPDIPRITDKVYPCHEVVKMDYFIPGCPPDADALFKVLDD	192
T.r. Hox2	VGVHNPGIPNDPEIPLLLNQVHPIHEVVAIDYFLPGCPPSADAIWTFLTE	162
T.th. Nqo6	-----NYAIVQNVDVVPVDVYVPGCPPRPEALYAVMQ	153
R.e. MBH	-----QATPVHKVITDKPIIKVPGCPPIAEVMTGVITY	163

**Abb. 13: Multipler Sequenzvergleich des N-terminalen Teils von HoxY von *R. eutropha* mit Untereinheiten von verwandten Hydrogenasen und Nqo6 von Komplex I aus *T. thermophilus*.** Cysteine, die höchstwahrscheinlich in der Koordination des [4Fe4S]-Clusters involviert sind, sind durch eine schwarze Box markiert. Zusätzliche Cysteine, die nur in (mutmaßlich) O<sub>2</sub>-toleranten bidirektionalen Hydrogenasen zu finden sind, sind rot, das Tandemcystein in Komplex I und in der MBH gelb und die zwei zusätzlich koordinierenden Cysteine des [4Fe3S]-Clusters in der MBH grün hervorgehoben (Goris *et al.* 2011). Die MBH-Sequenz ist nur in

Teilen dargestellt. Abkürzungen: *R.e.*, *Ralstonia eutropha*; *R.o.*, *Rhodococcus opacus*; *T.r.*, *Thiocapsa roseopersicina*; *Synco*, *Synechocystis* PCC6803; *Synco*, *Synechococcus* PCC7002; *T.th.*, *Thermus thermophilus*.

Komplex 1 aus *Thermus thermophilus* auf, dessen Kristallstruktur bekannt ist (Sazanov und Hinchliffe 2006). Der Sequenzvergleich von HoxHY mit verwandten Hydrogenasen und Nqo6 zeigt, dass drei der vier Cysteine, die potenziell einen [FeS]-Cluster koordinieren, in HoxY konserviert sind (Abbildung 14). Dagegen fehlt in HoxY eines der Tandem-Cysteine aus Nqo6, die eine wichtige Rolle in der Protonentranslokation in Komplex I (Berrisford und Sazanov 2009) spielen. Ein solches Tandem-Cystein-Motiv findet sich auch in der MBH von *R. eutropha* und ist dort in der Koordination des außergewöhnlichen [4Fe3S]-Clusters involviert (Fritsch *et al.* 2011; Goris *et al.* 2011). Neben den potenziell koordinierenden Cysteinen befinden sich in der SH von *R. eutropha*, wie auch in anderen mutmaßlichen sauerstofftoleranten bidirektionalen Hydrogenasen weitere Cysteine (Abbildung 13, rot markiert).

Das gereinigte Hydrogenasemodul wurde einer Metallbestimmung mittels TXRF unterzogen. In einem HoxHY-Molekül wurden Ni, Fe, Cr, Cu und Zn in einem Verhältnis von 1: 6,2: 0,3: 1,4: 0,4 nachgewiesen, was auf die Anwesenheit eines [4Fe4S]-Clusters neben dem Eisen im [NiFe]-Zentrum hinweist.



**Abb. 14: UV-Vis-Absorptions-Spektroskopie am Hydrogenase-Modul.** **A:** Absorptionsspektren oxidierter (67,1  $\mu$ M Hydrogenase-Dimer, schwarze Kurve) und mit Dithionit reduzierter (100  $\mu$ M DT, rote Kurve) HoxHY-Proben. **B:** Differenzspektrum aus reduzierter-minus-oxidierter Probe. Die relevanten Absorptionsmaxima sind durch Dreiecke mit jeweiliger Wellenlänge (nm) gekennzeichnet.

Die Anwesenheit eines [FeS]-Clusters im Hydrogenase-Modul wird unterstützt durch das UV-Vis-Absorptionsspektrum der oxidierten HoxHY-Probe, das eine sehr breite, für [Fe-S]-Cluster typische Absorption zwischen 350 und 500 nm mit einer Schulter bei 415 nm aufweist (Abbildung 13 (Ragan *et al.* 1982; Lippard und Berg 1994; Braun *et al.* 1998)). Die EPR-Analysen am isolierten HoxHY-Protein bei Temperaturen zwischen 10 K und 80 K, die von Dr. Miguel Saggi an der TU Berlin durchgeführt wurden, zeigten weder Signale vom

[NiFe]-Zentrum noch von dem [Fe-S]-Cluster in HoxHY. Ebenfalls keine EPR-Signale waren nach Behandlung mit Dithionit oder H<sub>2</sub> nachweisbar.

Das Hydrogenase-Modul bietet ein hervorragendes System, um experimentell zu überprüfen, ob ein zweites FMN in der SH vorhanden ist. Das UV-Vis-Spektrum des mit 0,1 mM Na-Dithionit behandelten Hydrogenase-Moduls zeigte distinkte Maxima bei 382 nm und 394 nm (Abbildung 14B), die charakteristisch sind für die anionische Semichinon-Radikalform des Flavins, wobei die Schultern bei 555 nm und 600 nm Indizien für neutral geladene Semichinon-Radikale sind (Massey und Palmer 1966; Nöll 2008; Okafuji *et al.* 2010). Eine entsprechende FMN-Fluoreszenz-Bestimmung ergab 0,05 FMN pro HoxHY-Einheit. Die substöchiometrischen FMN-Mengen in HoxHY sind im Einklang mit den generell zu geringen mit herkömmlichen Proteinbestimmungsmethoden experimentell bestimmten Mengen von FMN in der nativen SH. Die erhöhte Wasserstoffoxidaionsaktivität nach Zugabe von FMN und die Ergebnisse der UV-Vis-Spektroskopie sprechen jedoch für ein FMN-Molekül im Hydrogenase-Modul.

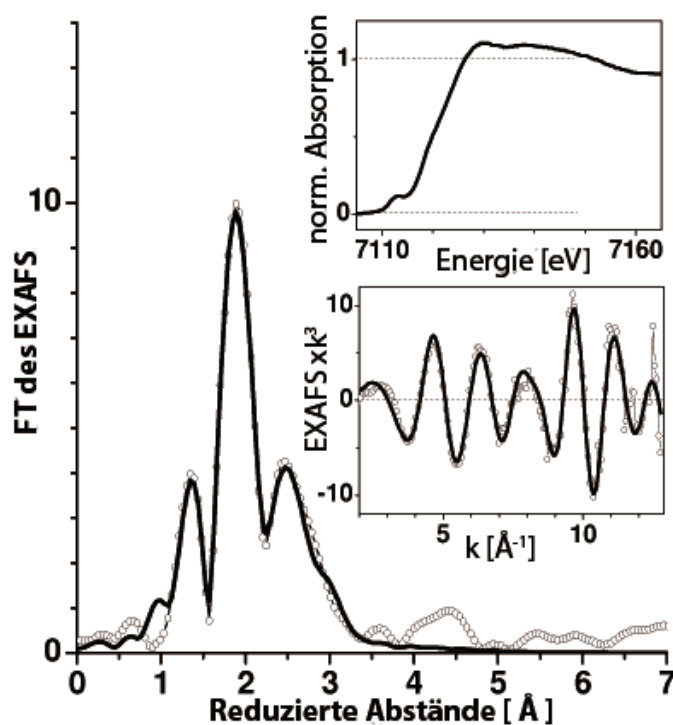
### 3.3.4 Röntgenabsorptionsspektroskopie am HoxHY-Modul

Die Koordination der Eisenatome im [Fe-S]-Cluster und im [NiFe]-Zentrum im oxidierten HoxHY-Modul wurde von Dr. Michael Haumann (Freie Universität Berlin) mittels Röntgenabsorptionsspektroskopie, („X-ray Absorption Spectroscopy“, XAS) untersucht und ausgewertet. Die Röntgenabsorptionsspektroskopie erlaubt Aussagen über lokale geometrische und elektronische Strukturen von Elementen, wobei die Absorption monochromatischer Röntgenstrahlung eines Synchrotrons im Bereich einer für das jeweilige Element (Metall) spezifischen Absorptionskante gemessen wird. Besitzt ein Photon ausreichend Energie, kann ein Elektron von einem kernnahen Orbital in ein höheres Orbital angeregt werden, wobei die Absorption der Röntgenstrahlung ansteigt. Dies liefert Auskunft über unbesetzte Orbitale für das untersuchte chemische Element. Die EXAFS-Spektroskopie (extended X-ray absorption fine structure, EXAFS) ist ein spezielles XAS-Verfahren zur Analyse der kantennahen Feinstruktur eines Röntgenspektrums. Mit dieser Methode kann die Anzahl, Art und Entfernung von Nachbaratomen/Liganden eines bestimmten chemischen Elements bestimmt werden (Dau *et al.* 2003).

Das EXAFS-Spektrum des HoxHY-Moduls, welches an der Fe-Kante aufgenommen wurde, ist in Abbildung 15 gezeigt. Im Gegensatz zu Spektren von lediglich von Schwefelatomen koordinierten Eisenkomplexen, zeigte sich für das Spektrum von HoxHY ein relativ großes primäres Maximum, wohingegen die „Vorkante“ (pre-edge) bei etwa 7113 eV gering ausgeprägt war. Die Kantenform war jedoch ähnlich zu denen von [FeFe]-Hydrogenasen mit



Beiträgen von Fe-S- und Fe-C(=O/N)-Interaktionen aus dem H-Cluster (Stripp *et al.* 2009; Stripp *et al.* 2009). Daher können auch für das HoxHY-Modul ein von C(O/N) und Schwefel koordiniertes [NiFe]-Zentrum sowie ein Fe-S-Cluster angenommen werden. Zudem lässt sich ein durch Sauerstoff ligandiertes Eisenatom vermuten. Eine Simulation des EXAFS-Spektrums wies einen relativen hohen Anteil von kurzen Fe-C(O/N)-Bindungen mit einer Bindungslänge von 1.84 Å auf (Tabelle 6)



**Abb. 15: Eisen-XAS-Analyse am HoxHY-Protein.** Die Fourier-Transformation (FT) der EXAFS-Oszillationen (unterer Teilbereich) zeigt Maxima durch Fe-C(O/N)-, Fe-S/O- und Fe-Fe/Ni-Distanzen. Experimentelle Daten sind als offene Kreise, EXAFS-Simulationen mit Parametern in Tabelle 5 sind als durchgehende Linie gezeigt. Das entsprechende Eisenspektrum ist im oberen Teilbereich gezeigt.

Die Koordinationszahl, die die Anzahl der Liganden zu dem entsprechenden Element angibt, von ca. 0,7 für die Fe-C(oder O/N)-Interaktionen, lag in der Größenordnung von 0,5, die für ein durch drei diatomare Liganden koordiniertes Eisen im aktiven Zentrum sowie insgesamt ca. sechs Eisenionen in der Probe zu erwarten gewesen wäre. Simulationen deckten drei verschiedene Metall-Metall-Abstände auf. Der kürzeste bestimmte Abstand von 2,52 Å wurde auf die Ni-Fe-Distanz im aktiven Zentrum zurückgeführt. Im Falle der Anwesenheit eines Eisens im aktiven Zentrum sowie eines zusätzlichen [2Fe-2S]-, [3Fe-4S]- oder [4Fe-4S]-Clusters werden Koordinationszahlen für Fe-Fe-Abstände von 2,7 Å von ungefähr 0,7, 1,5 bzw. 2,4 erwartet. Für das HoxHY-Modul wurde eine Fe-Fe-Koordinationszahl von 2,1 im Abstand von 2,7 Å detektiert. Dies ist typisch für einen [4Fe-4S]-Cluster, wie er auch in der [FeFe]-Hydrogenase von *C. reinhardtii* gefunden wurde (Stripp *et al.* 2009). Die EXAFS-Analyse offenbarte eine geringe Menge von Metall-Metall-Abständen bei 3,37 Å und eine Fe-



O-Bindung von 2,14 Å (Tabelle 6). Wahrscheinlich stammen diese von Fe-O-Fe-Motiven in oxidativ modifizierten [Fe-S]-Clustern und/oder von unspezifisch gebundenem Eisen in der Probe. Letzteres würde auch durch das durchschnittliche Fe/Ni-Verhältnis von ungefähr 6 erklärt werden. Ein solcher Beitrag verändert die tatsächliche Koordinationszahl von Fe-Fe-Abständen bei 2,7 Å und erklärt, dass der entsprechende Wert für  $N_{2,7\text{Å}}$  nicht vollständig in Übereinstimmung mit dem erwarteten Wert für einen [4Fe4S]-Cluster ist ( $N_{2,7\text{Å}} = 2,4$ ). Ebenso war die Koordinationszahl für [Fe-S]-Interaktionen von ca. 3,2 (Tabelle 6) in Übereinstimmung mit dem Wert von etwa 3,3, der für zwei Fe-S-Bindungen am aktiven Zentrum, einem [4Fe4S]-Cluster und ca. 6 Eisen in der Probe berechnet wurde.

**Tabelle 6: EXAFS-Simulationsparameter für Abbildung 16.**  $N_i$ : Koordinationszahl;  $R_i$ : Metall-Rückstreuungs-Distanz,  $2\sigma_i^2$ : Debye-Waller-Parameter (beschreibt die Temperaturabhängigkeit der Intensität der kohärent elastisch gestreuten Strahlung an einem Kristallgitter)

Schale	$N_i$ [pro Metall]	$R_i$ [Å]	$2\sigma_i^2$ [Å <sup>2</sup> ]
C(O/N)	0,74 <sup>#</sup>	1,84	0,002 <sup>*</sup>
O	1,05 <sup>#</sup>	2,14	0,002
S	3,21 <sup>#</sup>	2,24	0,007 <sup>*</sup>
Ni	0,64	2,52	0,002 <sup>*</sup>
Fe	2,11	2,70	0,005 <sup>*</sup>
(C)O/N <sub>ms</sub>	0,74	2,98	0,005 <sup>*</sup>
Fe	0,68	3,38	0,005 <sup>*</sup>

<sup>#</sup>Die Summe der Koordinationszahlen wurde auf 5 begrenzt; <sup>\*</sup> Parameter, die zu physikalisch sinnvollen Werten in den Simulationen korrigiert wurden. Die Koordinationszahl von mehrfachen Streuungen („multiple scattering“, ms) und Anteilen von (C)O/N-Liganden wurde mit denen von Fe-C(O/N) gleichgesetzt

Die EXAFS-Analyse in Kombination mit der Aminosäure-Sequenzanalyse, der Metallbestimmung und dem UV-Vis-Spektrum weist auf die Präsenz eines [4Fe4S]-Clusters in HoxHY hin. In einem geringeren Anteil der Probe ist dieser Cluster wahrscheinlich durch oxidative Modifikation zu einer [4Fe-nS-nO]-Spezies konvertiert.

### 3.3.5 Elektrochemische Untersuchungen des Hydrogenase-Moduls

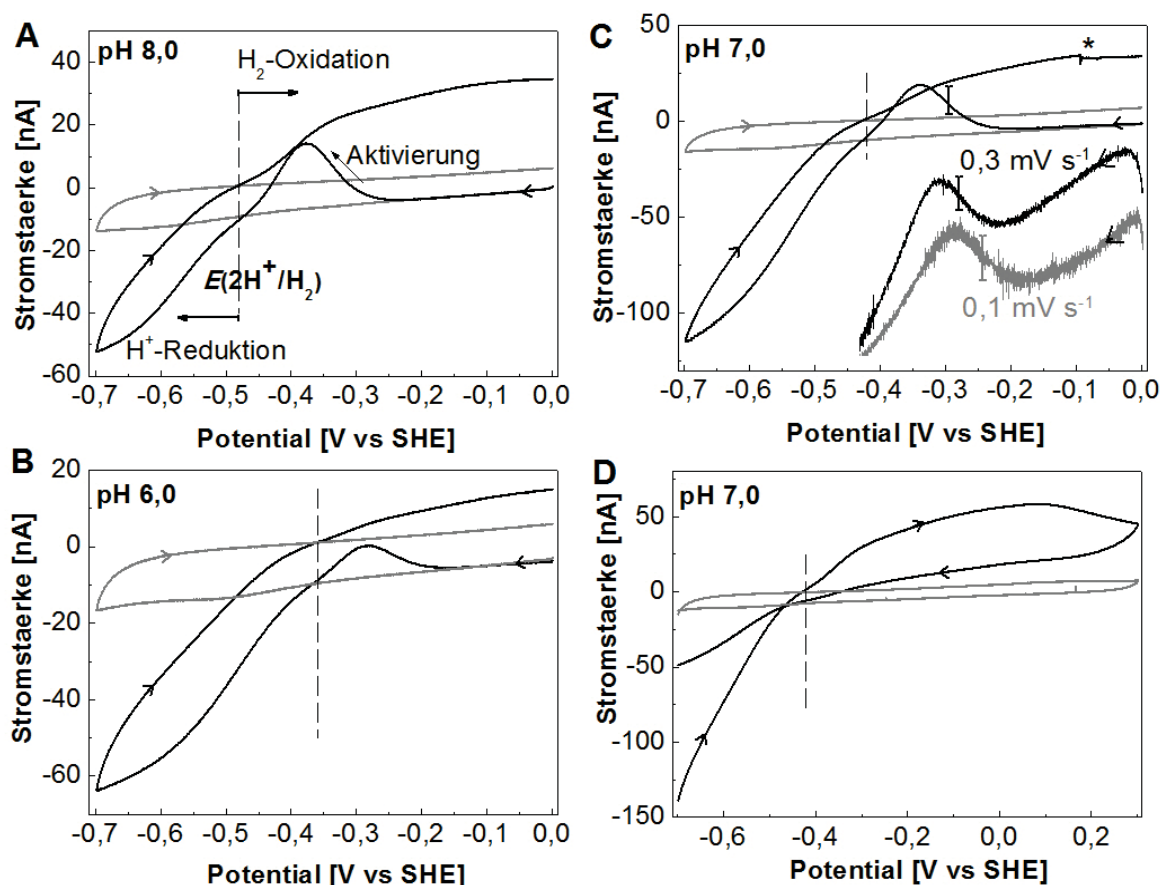
Die katalytischen Eigenschaften des Hydrogenase-Moduls sollten mittels Proteinfilm-Voltammetrie charakterisiert werden, bei der das Enzym durch Adsorption auf eine pyrolytische Graphitelektrode (pyrolytic graphite edge PGE) immobilisiert wird und in der Lage ist, mit dieser Elektronen auszutauschen. Dies ermöglicht mehrere elektrochemische Untersuchungen an demselben Proteinfilm ohne künstlichen Elektronenakzeptor. Zudem wird nur wenig Probenmaterial (0,2-2 µg) benötigt. Über einen Potentiostat wird das Potential der

Elektrode mit dem Proteinfilm eingestellt. Findet  $\text{H}_2$ -Oxidation statt, werden die produzierten Elektronen direkt auf die Graphitoberfläche abgeleitet. Ereignet sich  $\text{H}^+$ -Reduktion, werden die benötigten Elektronen von der Elektrode durch die Hydrogenase auf Protonen übertragen. Beide Prozesse können als sogenannte katalytische Ströme gemessen werden. Änderungen in der Stromstärke beruhen daher auf Veränderungen in der Enzymaktivität. Die Vorteile der Elektrochemie sind, dass nur aktives Enzym untersucht wird, verschiedene Gase oder Gasgemische leicht in den Kopfraum der elektrochemischen Zelle eingebracht werden können und durch eine schnelle Rotation der Elektrode kaum Konzentrationsgradienten zwischen Lösung und Elektrodenoberfläche entstehen (Vincent *et al.* 2007). Ein weiterer Vorteil besteht in dem hohen Überpotential von Graphit für Sauerstoffreduktion, so dass Experimente zur Sauerstofftoleranz von Hydrogenasen problemlos bei Potentialen über 0 mV durchgeführt werden können. Mittels zyklischer Voltammetrie, bei der das elektrische Potential kontinuierlich über einen weiten Bereich zyklisch verändert und die daraus resultierende Stromstärke aufgenommen wird, können die katalytische Präferenz („Bias“, die Rate der  $\text{H}_2$ -Produktion relativ zur  $\text{H}_2$ -Oxidation), das Überpotential (erhöhtes Redoxpotential, an dem katalytische Ströme auftauchen im Vergleich zum Normalpotential der Redoxpartner) und das Reaktivierungspotential ( $E_{\text{switch}}$ ) des adsorbierten Enzyms bestimmt werden. Mit Hilfe der Chrono-Amperometrie, bei der ein konstantes elektrochemisches Potential angelegt wird und zeitabhängig die Stromstärke erfasst wird, können z. B. die Sauerstofftoleranz und Produktinhibition der Hydrogenasen untersucht werden. Die elektrochemischen Experimente am Hydrogenase-Modul wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Juan Liu und Dr. Kylie Vincent (Institute of Chemistry, University of Oxford) untersucht.

### 3.3.6 Reaktivierung des HoxHY-Moduls

Das gereinigte HoxHY-Modul wurde auf eine Graphitelektrode aufgebracht (siehe Material und Methoden) und zyklische Voltammogramme (engl. “cyclic voltammograms“, im Folgenden mit CV abgekürzt) wurden bei pH-Werten von 6,0, 7,0 und 8,0 in Gegenwart von Wasserstoff aufgenommen. Die CVs zeigten, dass das Hydrogenase-Modul nach einem reduktiven Aktivierungsprozess in der Lage war,  $\text{H}_2$  zu oxidieren und Protonen zu reduzieren (Abbildung 16ABC). Das Verhalten einer nicht mit Protein beladenen PGE-Elektrode unter analogen Bedingungen ist ebenfalls gezeigt (graue Kurve). Hier wird der kapazitive Hintergrundstrom im Vergleich zu dem relativ niedrigen elektrokatalytischen Strom des Hydrogenase-Heterodimers deutlich. Die Elektrode drehte sich während dieser Experimente nicht, um eine Destabilisierung des Proteinfilms zu vermeiden. Für das CV in Abbildung 16C wurde die Elektrode für eine kurze Zeit gedreht (angegeben mit einem Sternchen \*), um zu

zeigen, dass der Strom nicht durch Stoffaustausch, in diesem Fall von  $H_2$ , begrenzt war. Die zyklischen Voltammogramme in den Abbildungen 16A-C wurden bei einer relativ langsamen Scan-Rate von 1 mV/s aufgezeichnet, bei 0 V gestartet und in negative Richtung bis -0,7 V verändert, um die reduktive Aktivierung des isolierten Enzyms zu untersuchen. Im Bereich von 0 V bis -0,25 V blieb die Stromstärke bei nahe Null, da das unbehandelte (oxidierte) HoxHY-Modul  $H_2$  nicht oxidieren kann. Bei dem CV, das bei pH 8,0 aufgenommen wurde (Abbildung 15A), begann die Stromstärke bei etwa -0,25 V zu steigen. Bei diesem Potential wurde HoxHY reaktiviert und die  $H_2$ -Oxidation begann. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass das HoxHY-Modul in Lösung mit dem Reduktionsmittel Dithionit reaktiviert werden muss (-750 mV bei pH 8,0) (Mayhew 1978). Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Anwesenheit von  $H_2$  allein nicht ausreicht, um HoxHY zu aktivieren.



**Abb. 16: Reduktive Reaktivierung des HoxHY-Heterodimers.** Die zyklischen Voltammogramme (CV) wurden mit einer Scan-Rate von 1 mV/s in K-PO<sub>4</sub>-Puffer (50 mM) bei den angegebenen pH-Werten, 30 °C und in Gegenwart von 1 bar H<sub>2</sub> aufgezeichnet. Die Scans **A-C** und **D** wurden 20 s nach dem Einstellen von 0 V bzw. -0,7 V vs. SHE („standard hydrogen electrode“) gestartet. Die Richtung jedes Scans ist durch Pfeilspitzen markiert. Die Position  $E^\circ(2\text{H}^+/\text{H}_2)$  (Redoxpotential), ist als gestrichelte vertikale Linie auf jedem CV angegeben und wurde nach der Nernst-Gleichung für die experimentellen Bedingungen korrigiert. Das Signal einer unmodifizierten PGE-Elektrode unter analogen Bedingungen ist als graue Linie dargestellt. In **C** sind Scans für verschiedene Scanraten gezeigt. Aufgrund des Proteinfilmverlustes als Folge der geringen Scanraten (0,3 mV s<sup>-1</sup> und 0,1 mV s<sup>-1</sup>) ist die katalytische Stromstärke gering und wurde daher um den Faktor 100 vergrößert. Für eine bessere Darstellung wurden die beiden CVs nach unten verschoben. Das Reaktivierungspotential  $E_{\text{switch}}$  ist jeweils als vertikaler Balken angegeben.

Der katalytische Strom wurde geringer, als die thermodynamische Kraft für H<sub>2</sub>-Oxidation abnahm und wurde dann negativ, da bei Potentialen, die negativer sind als das Redoxpotential des Paares 2H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>, die H<sup>+</sup>-Reduktion begann. Dadurch erscheint bei den CVs in Abbildung 16A-C ein charakteristischer Reaktionspeak bei der zuerst die Stromstärke positiver wurde und dann wieder abfiel. Bei der Rückkehr zu höheren Potentialen (positiver als  $E(2\text{H}^+/\text{H}_2)$ ) setzte die H<sub>2</sub>-Oxidation wieder ein. Wurde der Zyklus unter den gleichen Bedingungen wiederholt, fehlte der Reaktivierungspeak (nicht dargestellt). Sowohl H<sub>2</sub>-Oxidation als auch H<sup>+</sup>-Reduktion beginnen nahe am Redoxpotential des Protonen-Wasserstoffpaares. Dies bedeutet, dass HoxHY beide Reaktionen mit lediglich minimalem Überpotential katalysiert. Die Voltammogramme in Abbildung 16C zeigen, dass sich die Position des Reaktivierungspeaks für gereinigtes HoxHY-Protein auf positivere Werte verschob, wenn die Potentialänderungen langsamer stattfanden. Aufgrund der Instabilität der HoxHY-Filme auf

der Elektrode konnte die Scanrate allerdings nicht geringer als 0,1 mV/s eingestellt werden. Daher ließ es sich nicht feststellen, ob der Reaktivierungsspeak sich noch weiter zu positiveren Potentialen verschiebt. Die Reaktivierungspotentiale in Abbildung 16 beruhen daher sowohl auf thermodynamischen als auch kinetischen Beiträgen des HoxHY-Enzyms. Das Potential „E<sub>switch</sub>“ ist ein Parameter, der verwendet wird, um die Reaktivierung von [NiFe]-Hydrogenasen zu beschreiben. Er definiert das Potential (E), bei dem der stärkste Anstieg des Stromes während der Hydrogenase-Aktivierung zu beobachten ist. Um E<sub>switch</sub> verlässlich zu bestimmen, muss die Scanrate im Vergleich zu der Reaktivierungsgeschwindigkeit langsam sein (Vincent *et al.* 2006; Vincent *et al.* 2007). Da die Scanrate nicht noch weiter gesenkt werden konnte, wurden die ermittelten E<sub>switch</sub>-Werte bei einer bestimmten Scanrate miteinander verglichen. Sie erlaubten den Vergleich verschiedener Hydrogenasen und geben einen Hinweis wie unterschiedliche Bedingungen Auswirkungen auf das katalytische Verhalten der jeweiligen Hydrogenase haben (Fourmond *et al.* 2010). Das unbehandelte HoxHY-Protein zeigte bei einer Scanrate von 1 mV/s und pH-Werten von 8,0, 7,0 und 6,0 E<sub>switch</sub>-Werte von -340 mV, -300 mV bzw. -245 mV. Die pH-Abhängigkeit weist darauf hin, dass die reduktive Reaktivierung mit Protonierungsreaktionen einhergeht. Die Beobachtung, dass die Reaktivierung des unbehandelten HoxHY-Proteins bei relativ negativen Potentialen stattfindet, ist konsistent mit der Reaktivierbarkeit des nativen SH-Enzyms durch NADH, welches zumindest in geringen Mengen *in vivo* stets verfügbar ist. (Schneider und Schlegel 1976; Burgdorf *et al.* 2005).

Elektrochemische Untersuchungen am HoxHY-Modul in Gegenwart von FMN wurden ebenfalls durchgeführt. Da FMN allerdings selbst stark an Graphit adsorbiert, führt dessen 2-Elektronen-Oxidation bzw. -Reduktion zu intensiven Strompeaks, die das Voltammogramm dominieren und die HoxHY spezifischen katalytischen Ströme überdecken (Abbildung S6). Daher wurden alle weiteren elektrochemischen Experimente in der Abwesenheit von FMN durchgeführt. Außerdem konnte über die Beladung der Elektrodenoberfläche mit HoxHY-Protein keine Aussage getroffen werden. Hierfür wäre die Sichtbarkeit von nicht-katalytischen, kapazitiven Strömen Voraussetzung, hervorgerufen durch Oxidation bzw. Reduktion von proteingebundenem FMN oder [Fe-S]-Clustern. Solche Ströme, die in Abwesenheit von Substraten (H<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>) gemessen werden können, waren allerdings nicht detektierbar. Dies lässt sich auf eine sehr geringe Proteinbeladung der Elektrodenoberfläche zurückführen, was bei dem gewählten Versuchsaufbau allerdings die Regel ist.

Die meisten [NiFe]-Hydrogenasen zeigen unter anaeroben Bedingungen eine charakteristische reversible Inaktivierung bei hohem Potential. Diese Inaktivierung wird mit

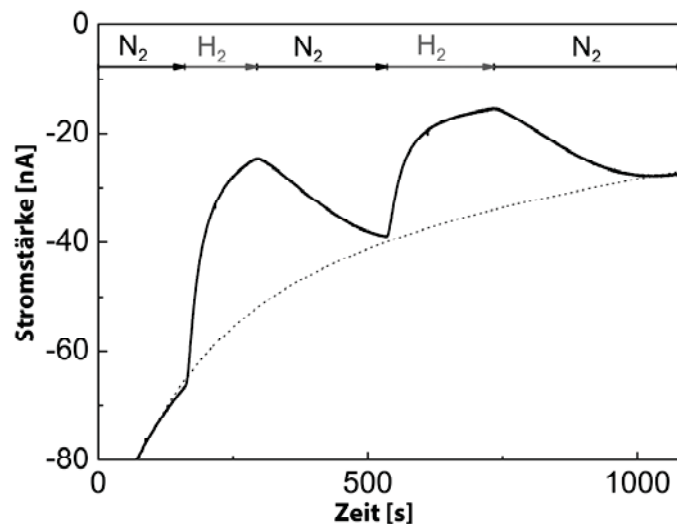
der Ausbildung des Ni<sub>r</sub>-B-Zustands in Zusammenhang gebracht (Vincent *et al.* 2007). Abbildung 16D zeigt ein zyklisches Voltammogramm für HoxHY, in dessen Verlauf das Potential mit 1 mV/ s langsam von -700 auf +300 mV angehoben wurde. Bei Potentialen über 0 mV sank die Aktivität zwar deutlich, jedoch war bei der Rückkehr von +300 mV zu negativen Potenzialen keine reduktive Reaktivierung, d.h. ein Stromanstieg, zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass HoxHY keinen konventionellen Ni<sub>r</sub>-B-Zustand ausbildet und bestätigt, dass das isolierte Enzym nur eine einmalige reduktive Aktivierung für die Katalyse benötigt. Der irreversible Verlust der Aktivität bei hohem Potential ist wahrscheinlich auf einen potentialabhängigen Verlust des Proteinfilms oder einer Beschädigung des Proteins zurückzuführen.

### 3.3.7 Katalytische Präferenz („Bias“)

Die zyklischen Voltammogramme, die mit einem HoxYU-Proteinfilm aufgenommen wurden, zeigten, dass das Hydrogenase-Modul sowohl die H<sup>+</sup>-Reduktion als auch die H<sub>2</sub>-Oxidation katalysiert (Abbildung 16). Der gemessene katalytische Strom ist proportional zur Aktivität des Enzyms. Daher wurde der H<sup>+</sup>-Reduktionsstrom mit dem H<sub>2</sub>-Oxidationsstrom verglichen, um daraus ein Maß für die katalytische Präferenz („Bias“) zu bestimmen. In der natürlichen Umgebung schwankt die Konzentration und damit der Partialdruck von Wasserstoff. Zudem ändert sich das NAD<sup>+</sup>/NADH-Verhältnis und somit das intrazelluläre Redoxpotential in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen. Physiologisch relevante Potentiale für die Funktion von HoxHY liegen wahrscheinlich im Bereich des Redoxpotentials von  $\pm 150$  mV für das 2H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>-Paar. Bei pH 8,0 und 1 bar H<sub>2</sub>, war die H<sup>+</sup>-Reduktionsaktivität bei 150 mV unterhalb von E(2H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>) nur 1,2-fach größer als die H<sub>2</sub>-Oxidationsaktivität 150 mV oberhalb von E(2H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>) (Abbildung 16A). Wie zu erwarten war, stieg die relative H<sup>+</sup>-Reduktion mit der Verfügbarkeit von Protonen: In Gegenwart von 1 bar H<sub>2</sub> betrug die H<sup>+</sup>-Reduktionsaktivität sowohl bei pH 6,0 als auch bei pH 7,0 ungefähr das Doppelte der H<sub>2</sub>-Oxidationsaktivität (Abbildung 16CB). Dies zeigt, dass das Hydrogenase-Modul der SH in beide Richtungen funktionieren kann, jedoch mit einer leichten Präferenz zur H<sup>+</sup>-Reduktion.

### 3.3.8 Produktinhibition durch Wasserstoff

Als nächstes wurde die  $H^+$ -Reduktionsaktivität von HoxHY auf Produktinhibition durch  $H_2$  untersucht. Das Experiment in Abbildung 17 wurde bei 10 °C durchgeführt, um die Stabilität des HoxHY-Proteins auf der Elektrode zu verbessern, da die erforderlichen Gasaustauschschritte über 15 min andauerten. Die  $H_2$ -Produktion von HoxHY wurde durch  $H_2$  nur zu 30-40 % gehemmt.



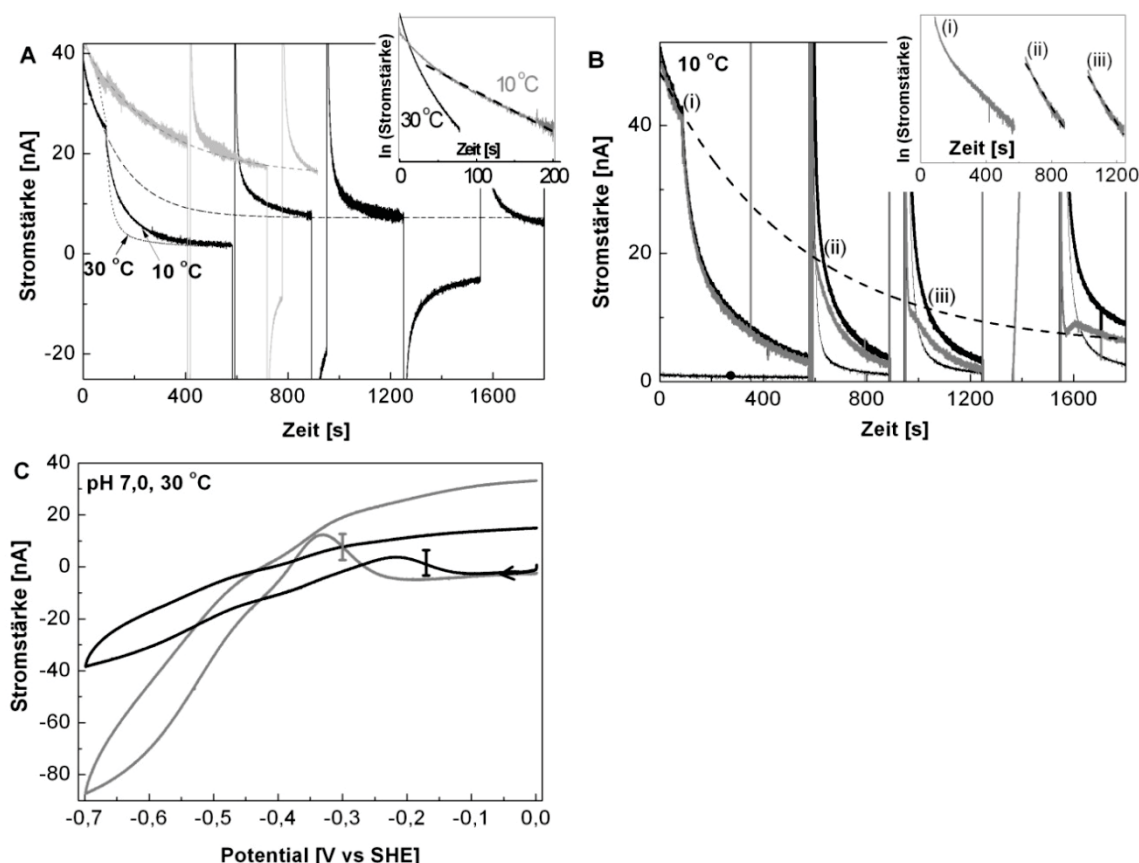
**Abb. 17: Bestimmung der Produktinhibition von HoxHY durch  $H_2$ .** Die Gase wurden zu angegebenen Zeitpunkten geändert (Flussrate jeweils 1 l/min). Die gestrichelte Linie gibt eine exponentielle Annäherungskurve für den Proteinfilmlverlust an. Weitere Bedingungen: 10 °C, pH 7,0, Elektrodenrotationsrate: 2000 rpm, Potential: -584 mV.

### 3.3.9 Sauerstofftoleranz des Hydrogenase Moduls

Die Sauerstofftoleranz der MBH konnte zuvor durch Proteinfilm-Elektrochemie untersucht werden (Vincent *et al.* 2005). Daher sollten auch die Auswirkungen von  $O_2$  auf HoxHY bestimmt werden (Abbildung 18). Der HoxHY-Proteinfilm wurde zuerst bei 10 °C reduktiv aktiviert (pH 7,0, -384 mV) und die Elektrode dann für 90 s auf ein Potential von +210 mV eingestellt, um die  $H_2$ -Oxidationsaktivität zu verfolgen. Das Potential ist dabei ausreichend hoch, um eine direkte Reduktion von  $O_2$  an Graphit zu vermeiden. Anschließend wurde der HoxHY-Proteinfilm mit einem Gasgemisch aus 98%  $H_2$  und 2 %  $O_2$  inkubiert. Dies führte dazu, dass die  $H_2$ -Oxidationsaktivität von HoxHY langsam, aber stetig auf nahezu null zurückging. Die Stromabfall innerhalb der ersten 35 s nach Inkubation mit  $O_2$  lässt sich mit einer Exponentialfunktion und somit einer chemischen Reaktion erster Ordnung beschreiben (Abbildung 18A). Die Inaktivierungsgeschwindigkeit betrug  $0,01\text{ s}^{-1}$ . Für die Inaktivierung bei 30 °C (Abbildung 18A, dunkle Linie, Einschub) war die Auswertung durch eine schlechtere Proteinfilm-Stabilität etwas komplizierter. Die halblogarithmische Darstellung zeigt, dass die Inaktivierung durch  $O_2$  bei dieser Temperatur etwa doppelt so schnell war. Die Abweichung



von einer Kinetik erster Ordnung, die während der ersten Sekunden nach O<sub>2</sub>-Inkubation zu beobachten war, wurde wahrscheinlich durch eine unvollständige Gasmischung hervorgerufen. Nach dem Entfernen von Sauerstoff durch Spülen mit einem Gemisch aus 98 % H<sub>2</sub> und 2 % N<sub>2</sub>, wurden drei aufeinanderfolgende reduktive Schritte (-384 mV) durchgeführt.



**Abb. 18: O<sub>2</sub>-Inhibition des Hydrogenase-Moduls.** **A:** Inaktivierung durch Sauerstoff und anschließende reduktive Reaktivierung in Abwesenheit von Sauerstoff. Zuerst wurde der HoxHY-Proteinfilm reduktiv reaktiviert. Die Wasserstoffoxidation wurde anschließend bei +210 mV und 10 °C verfolgt (dicke schwarze Linie). Nach 90 s wurde der HoxHY-Proteinfilm mit einem Gasgemisch aus 2 % O<sub>2</sub> und 98 % H<sub>2</sub> inkubiert. Drei aufeinanderfolgende reduktive Schritte (-384 mV) in Abwesenheit von Sauerstoff wurden anschließend zur Reaktivierung durchgeführt. Die gestrichelte Linie spiegelt ein analoges Experiment bei 30 °C wider. Die gestrichelte schwarze Linie zeigt eine exponentielle Extrapolation für den Proteinfilmverlust. Die breite graue Linie stellt ein Kontrollexperiment ohne Zugabe von O<sub>2</sub> dar. Der Einschub in (A) zeigt in einer halblogarithmischen Darstellung den Abfall der Stromstärke durch O<sub>2</sub>-bedingte Inaktivierung des Proteinfilms. **B:** Reduktive Reaktivierung in der Gegenwart von Sauerstoff (dicke schwarze Linie). Die dünne schwarze Linie zeigt ein analoges Experiment, in dem jedoch ein katalytisch inaktiver HoxHY-Film eingesetzt wurde, der durch oxidative Inaktivierung bei +0.5 V hergestellt worden war. Dieses Experiment diente der Ermittlung des kapazitiven Betrags der proteinbeladenen Elektrode. Die graue Linie repräsentiert das Resultat aus der Subtraktion des inaktiven vom aktiven Proteinfilm dar. Der Einschub in (B) zeigt in einer halblogarithmischen Skalierung den Abfall der Enzymaktivität durch O<sub>2</sub>-Inaktivierung. Für die in (A) und (B) gezeigten Experimente rotierte die Elektrode mit 2000 rpm und der Gasstrom betrug 1 l/min. **C:** Die Inkubation des Proteinfilms mit O<sub>2</sub> (2 %) nach vorheriger Reaktivierung führt zu einem neuen E<sub>switch</sub> (gekennzeichnet durch den vertikalen Balken). Die graue Linie repräsentiert das CV aus Abbildung 16C und ist zum Vergleich gezeigt. Weitere Bedingungen waren: 10 °C während der Inaktivierung und 30 °C während des CVs; die Scanrate betrug 1 mV/s.

Die katalytische Stromstärke bei +216 mV (nach jedem reduktiven Schritt) war ein Maß für die Reaktivierung (Abbildung 18A). Dabei wurde der Rückgang des kapazitiven Stroms

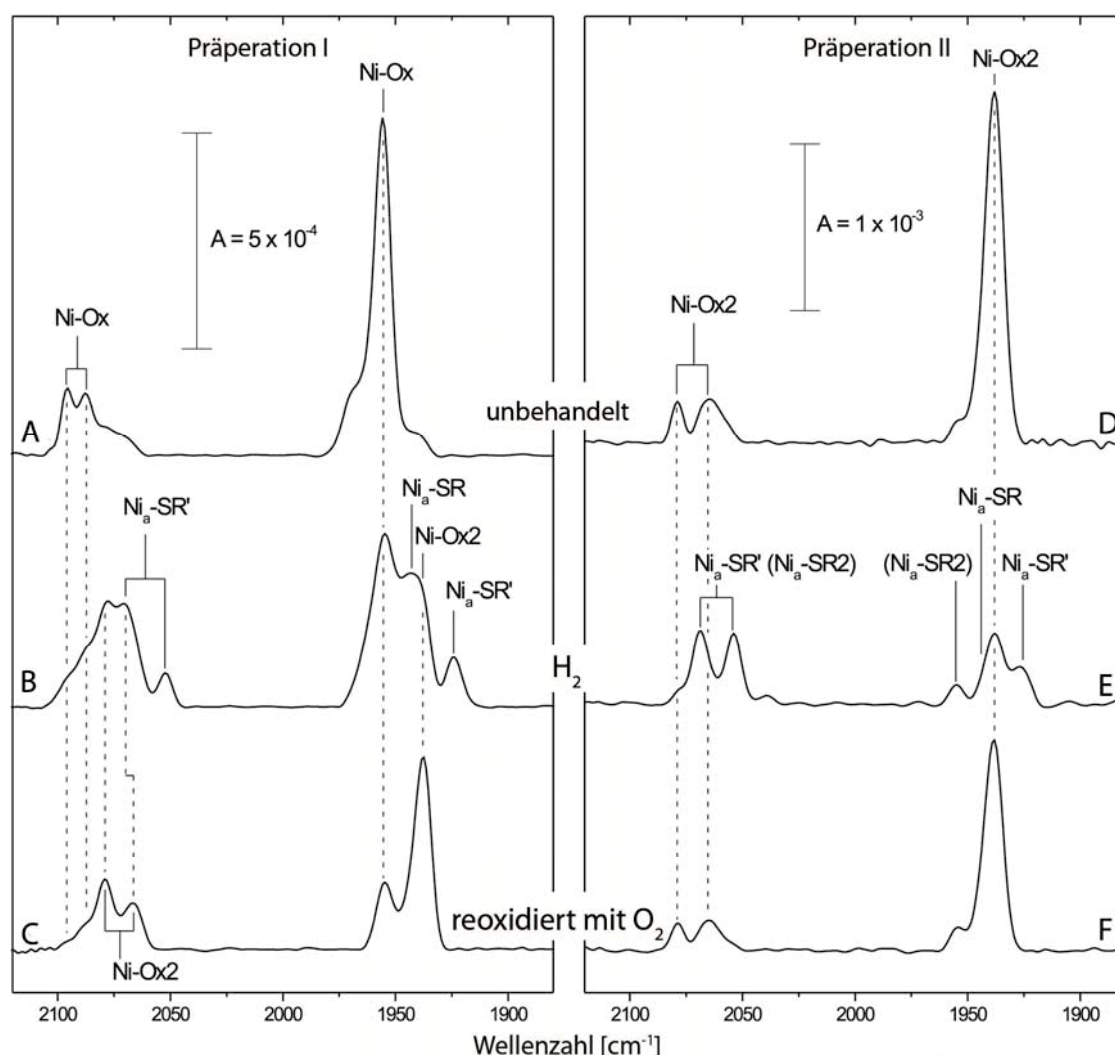
abgewartet, der durch den Potentialsprung hervorgerufen wurde. Der erste reduktive Schritt (10 s nach dem Start des Experiments) resultierte in einer deutlichen Erhöhung der H<sub>2</sub>-Oxidation. Zwei weitere längere reduktive Schritte (nach 900 s und 1250 s) führten zu keiner weiteren Erhöhung der Stromstärke. Um die Erniedrigung der H<sub>2</sub>-Oxidation durch den "Filmverlust" abzuschätzen, wurde eine exponentielle Funktion erster Ordnung für die ersten 90 s vor der Einführung von O<sub>2</sub> (gestrichelte schwarze Linie) eingeführt. Extrapoliert stimmt diese mit der H<sub>2</sub>-Oxidation nach der reduktiven Aktivierung überein. Dies deutet darauf hin, dass die H<sub>2</sub>-Oxidationsaktivität nach der reduktiven Reaktivierung in vollem Umfang wiederhergestellt wurde. Die Abbildung 18B zeigt, dass inaktives HoxHY sogar in der Gegenwart von O<sub>2</sub> reaktiviert werden kann. Genauso wie zuvor wurde HoxHY zuerst reduktiv reaktiviert und nach 90 s wurde 2 % O<sub>2</sub> hinzugegeben. Nach der Inaktivierung durch O<sub>2</sub> wurden kurze reduktive Schritte durchgeführt, wobei diesmal ein kontinuierliches Gasgemisch von 2 % O<sub>2</sub> und 98 % H<sub>2</sub> eingesetzt wurde (dicke schwarze Linie). Das Potential wurde auf +216 mV bei (ii) und (iii) wieder eingestellt, um die HoxHY-Aktivität zu bestimmen. Die katalytischen Ströme bei (ii) und (iii) sind aus zwei Faktoren zusammengesetzt. Der Anstieg durch die Restkapazität, der durch den Potentialsprung hervorgerufen war, ergab einen Hintergrundbeitrag. Ein Kontrollexperiment eines „toten“ Proteinfilms von HoxHY (dünne schwarze Linie, siehe Material und Methoden für Details) zeigte diesen Effekt deutlich. Die Subtraktion dieses kapazitiven Stromes von dem Gesamtstrom (dicke schwarze Kurve) wurde als graue Kurve wiedergegeben, um einen Hinweis auf den katalytischen HoxHY-Strom zu geben. Obwohl die Kapazität der Elektroden mit den unterschiedlichen Proteinfilmen nicht identisch war, macht dieses Experiment deutlich, dass die HoxHY-Aktivität durch die kurze reduktive Behandlung selbst in Gegenwart von O<sub>2</sub> wiederhergestellt wurde. Der elektrokatalytische Strom sank anschließend wieder durch O<sub>2</sub>-Inaktivierung. In der letzten Phase des Experiments wurde 2 % N<sub>2</sub>, 98 % H<sub>2</sub> durch den Kopfraum gespült, um O<sub>2</sub> zu entfernen. Die gestrichelte Linie stellt eine Annäherungskurve für den exponentiellen Abfall des HoxHY-Stroms durch Proteinfilmverlust dar. Aufgrund signifikanter Reduktion von O<sub>2</sub> bei Graphit unter 0 V konnte keine H<sub>2</sub>-Oxidation von HoxHY unter aeroben Bedingungen bei Potentialen in der Nähe des NAD<sup>+</sup>/NADH-Redoxpotentials ( $E^{\circ} = -320$  mV) direkt gemessen werden. Jedoch gaben die in Abbildung 18B dargestellten Experimente einen indirekten Nachweis, dass HoxHY in der Lage ist, volle Aktivität bei -384 mV in Gegenwart von 2 % O<sub>2</sub> zu erreichen, d. h. bei physiologisch relevanten Potentialen kann HoxHY die H<sub>2</sub>-Oxidation in der Gegenwart von O<sub>2</sub> katalysieren.

Es stellte sich die Frage, ob nach der Inaktivierung durch O<sub>2</sub> eine neue Redoxspezies entstand. Für das Beantworten dieser Frage wurde nach der Inaktivierung durch Sauerstoff und Wechseln des Gases auf 1 bar H<sub>2</sub> das Potential langsam in Richtung negativer Werte verändert. Dabei wurden potentialabhängige Reaktivierungen untersucht. HoxHY zeigte eine reduktive Reaktivierung mit einem veränderten E<sub>switch</sub> von -170 mV (siehe Abbildung 18C). Dies deutet darauf hin, dass die Reaktion mit O<sub>2</sub> bei +216 mV einen inaktiven Zustand erzeugte, der sich von der oxidierten, unbehandelten Probe unterschied (E<sub>switch</sub> = -300 mV).

Die elektrochemischen Experimente bestätigten, dass unter aeroben Bedingungen isoliertes HoxHY für die H<sub>2</sub>-Umwandlung eine reduktive Reaktivierung benötigt. Außerdem zeigten sie, dass HoxHY durch Sauerstoff nur langsam deaktiviert wird. Eine reduktive Behandlung durch Einstellen eines Redoxpotentials, das im Bereich des Standardpotentials des NAD<sup>+</sup>/NADH-Paares (E°' = -320 mV) liegt, kann HoxHY wieder reaktivieren.

### *3.3.10 Redoxverhalten des [NiFe]-Zentrums im Hydrogenase-Modul*

Um das Redoxverhalten des aktiven Zentrums von HoxHY zu charakterisieren, wurden Heterodimer-Präparationen mittels FTIR-Spektroskopie durch Philipp Hummel, Marius Horch und Dr. Ingo Zebger am Max-Volmer-Labor für Biophysikalische Chemie an der Technischen Universität Berlin untersucht.



**Abb. 19: FTIR-Spektren des HoxHY-Moduls.** Der linke Abschnitt stellt das Redoxverhalten der Präparation I, und der rechte Teilbereich das Redoxpotential der Präparation II dar. Die FTIR-Spektren der unbehandelten Proben sind gezeigt (A und D), sowie die FTIR-Spektren nach Reduktion mit Wasserstoff (B und E; in der Gegenwart von 2 mM FMN) und nach Re-Oxidation durch langsamen Zustrom von O<sub>2</sub> (C und F).

Die FTIR-Spektren von verschiedenen HoxHY-Reinigungen sind in Abbildung 19 gezeigt. Das aktive Zentrum des gereinigten, oxidierten HoxHY-Proteins wies zwei Redoxzustände auf, die als Ni-Ox (oxidiert) und Ni-Ox2 bezeichnet wurden und in unterschiedlichen Mengen auftraten (Abbildung S7). Die Variation im Verhältnis der beiden Redoxzustände lag wahrscheinlich an leicht unterschiedlichen O<sub>2</sub>-Expositionszeiten des Proteins während der Reinigung. HoxHY-Präparationen, die nach der Reinigung entweder überwiegend im Ni-Ox- (Präparation I) oder Ni-Ox2-Zustand (Präparation II) vorlagen, wurden hinsichtlich ihrer Redox Eigenschaften untersucht.

Die Abbildung 19A zeigt ein typisches FTIR-Spektrum von HoxHY, das hauptsächlich im Ni-Ox-Zustand vorlag. Es weist eine  $\nu(\text{CO})$ -Bande bei  $1956 \text{ cm}^{-1}$  und zwei  $\nu(\text{CN})$ -Banden bei  $2087$  und  $2096 \text{ cm}^{-1}$  auf. Die Lagen der jeweiligen Absorptionsbanden ähneln denen des oxidierten, inaktiven Ni<sub>u</sub>-A-Zustandes in Standard-[NiFe]-Hydrogenasen, wie z. B. dem

Enzym aus *D. vulgaris* Miyazaki F (Millo *et al.* 2009). Im Falle von HoxHY war der oxidierte Zustand jedoch EPR-inaktiv (Dr. Miguel Saggu, TU Berlin, persönliche Mitteilung). Die alleinige Inkubation des Proteins mit  $H_2$  führte nicht zur Ausbildung von reduzierten Zuständen, was in Einklang steht mit den entsprechenden elektrochemischen und photometrischen Daten (Kapitel 3.3.2 und 3.2.6). Reduzierte Zustände waren jedoch zu beobachten, wenn das Protein mit  $H_2$  und FMN inkubiert wurde (Abbildung 19B). Dies deutet darauf hin, dass FMN für die Reaktivierung notwendig ist. Die reduzierten Spezies wurden zum einen dem  $Ni_a$ -SR'-Zustand mit CO- und CN-Absorptionen bei 1923 und 2052/2069  $cm^{-1}$  und zum anderen dem  $Ni_a$ -SR-Zustand mit identischen CN-Absorptionen, aber einer CO-Bande bei 1946  $cm^{-1}$  zugeordnet. Zudem war eine weitere reduzierte Spezies zu beobachten, die als  $Ni_a$ -SR2 bezeichnet wird und sich durch eine hohe CO-Streckschwingungsfrequenz auszeichnet ( $\nu(CO)=1956$   $cm^{-1}$ ,  $\nu(CN)=2052, 2069$   $cm^{-1}$ ). Diese Spezies wurde kürzlich auch für die bidirektionale Hydrogenase aus *Synechocystis sp.* PCC 6803 beschrieben (Germer *et al.* 2009). Absorptionsbanden bei 1938, 2069, und 2079  $cm^{-1}$  spiegeln einen Restanteil des Ni-Ox2-Zustandes wider, wobei auch eine geringe Population des oxidierten Ni-Ox2-Zustandes mit Absorptionsbanden bei 1956, 2088, und 2096  $cm^{-1}$  in der Probe vorhanden war. Dies deutet darauf hin, dass ein Teil des HoxHY-Proteins redoxinaktiv war, womöglich wurde Flavin nicht vollständig eingebaut bzw. das Protein nicht vollständig reaktiviert. Die langsame Reoxidation des reduzierten Proteins durch den Austausch von  $H_2$  gegen Luft (über ca. 11 h) führte zu einem Rückgang aller  $Ni_a$ -SR-Spezies und einer Erhöhung der Ni-Ox2-Population, was eine partielle Reoxidation von HoxHY widerspiegelt (Abbildung 19C).

Die Inkubation der frisch isolierten, oxidierten Probe mit DTT oder TCEP hatte keinen Effekt auf den Redoxzustand des aktiven Zentrums. Jedoch führte die Inkubation des Enzyms im Ni-Ox-Zustand mit Dithionit ebenfalls zur Ausbildung von  $Ni_a$ -SR-Zuständen (Abbildung S8). Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der *in vitro*- $H_2$ -Produktion und der Elektrochemie (Kapitel 3.3.2 und 3.3.6). Hier konnte gezeigt werden, dass die Reaktivierung von HoxHY durch künstliche Elektronendonoren oder durch eine Elektrode nicht notwendigerweise abhängig ist von der Zugabe von FMN. Diese Beobachtungen deuten auf unterschiedliche Aktivierungsmechanismen oder verschiedene intramolekulare Elektronentransferwege hin, da die Reduktion des HoxHY-Proteins mit  $H_2$  ein strikt FMN-abhängiger Prozess in der FTIR-Spektroskopie war.

Die Abbildung 19D zeigt das FTIR-Spektrum einer Probe, die sich vor allem im Ni-Ox2-Zustand befand. Die Reduktion mit  $H_2$  in Gegenwart von FMN ist gekennzeichnet durch Absorptionen bei 1926, 2054, und 2069  $cm^{-1}$ , die der  $Ni_a$ -SR'-Spezies zugeordnet werden

können (Abbildung 19E). Die zusätzliche Schulter bei 1944  $\text{cm}^{-1}$  ist ein Indikator für den  $\text{Ni}_a$ -SR-Zustand.

**Tabelle 7: CO- und CN-Streckschwingungsfrequenzen (in  $\text{cm}^{-1}$ ) aller Redoxzustände, die in SH-haltigen Zellen *in situ* und für die isolierten SH Derivate (*in vitro*) beobachtet wurden.** Als Vergleich dienten die cyanobakterielle SH aus *Synechocystis sp.* PCC 6803, die sauerstoffsensitive Standardhydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F und die sauerstofftolerante MBH aus *R. eutropha* (Germer *et al.* 2009), (Millo *et al.* 2009), (Kellers *et al.* 2009; Saggu *et al.* 2009). Abkürzungen: n.d. nicht nachgewiesen.

	SH-Derivat aus <i>R. eutropha</i>				SH aus <i>Synch.</i>			MBH aus <i>D. vulgaris</i> Miyazaki F			MBH aus <i>R. eutropha</i>		
Redox- zustand		$\nu(\text{CO})$	$\nu(\text{CN})$		$\nu(\text{CO})$	$\nu(\text{CN})$		$\nu(\text{CO})$	$\nu(\text{CN})$		$\nu(\text{CO})$	$\nu(\text{CN})$	
<b>Ni<sub>a</sub>-B- ähnlich</b>	WT <i>in situ</i>	1957	2079	2089									
	WT <i>in vitro</i>	1957	2078	2087									
	HoxHY	n.b.	n.b.	n.b.									
<b>Ni<sub>a</sub>-C</b>	WT <i>in situ</i>	1961	2080	2091	1968	2079	2093	1961	2074	2085	1957	2075	2097
	WT <i>in vitro</i>	1961	2080	2090									
	HoxHY	-	-	-									
<b>Ni<sub>a</sub>-SR</b>	WT <i>in situ</i>	1946	2069	2080	n.d.	n.d.	n.d.	1948	2061	2074	1948	2068	2087
	WT <i>in vitro</i>	1946	2069	2080									
	HoxHY	1946	-	-									
<b>Ni<sub>a</sub>-SR'</b>	WT <i>in situ</i>	1922	2052	2068	n.d.	n.d.	n.d.	1932	2052	2066	1926	2049	2075
	WT <i>in vitro</i>	1921	2050	2069									
	HoxHY	1923	2052	2069									
<b>Ni<sub>a</sub>-SR''</b>	WT <i>in situ</i>	1913	2052	2068	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1919	2046	2071
	WT <i>in vitro</i>	1912	-	-									
	HoxHY	1914	2050	2069									
<b>Ni<sub>a</sub>-SR2</b>	WT <i>in situ</i>	1958	2068	2080	1955	2063	2079	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	WT <i>in vitro</i>	1958	-	-									
	HoxHY	1956	2057	2069									
<b>Ni<sub>a</sub>-S</b>	WT <i>in situ</i>	1946	2080	2091	1947	2078	2093	1943	2074	2086	1936	2075	2093
	WT <i>in vitro</i>	1946	2079	2089									
	HoxHY	1947	2078	2093									
<b>Ni-L</b>	WT <i>in vitro</i> <sup>#</sup>	1905	2084	2096				1911	2048	2061	1899	2040	2065
<b>Ni-Ox</b>	HoxHY	1956	2087	2096	n.d.	n.d.	n.d.	Ni <sub>u</sub> -A: 1956	2085	2094	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Ni-Ox2</b>	HoxHY	1938	2065	2079	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Ni <sub>u</sub> -S : 1930	2060	2076

Die größere Amplitude der CN-Absorptionsbanden im Vergleich mit dem Spektrum des oxidierten Proteins sowie die Verschiebung der niederfrequenten CN-Absorptionsbande um 2  $\text{cm}^{-1}$  zu einer höheren Wellenzahl legt nahe, dass die  $\nu(\text{CO})$ -Bande bei 1955  $\text{cm}^{-1}$  auf die Präsenz des  $\text{Ni}_a$ -SR2-Zustandes zurückzuführen ist. Eine Restpopulation der Ni-Ox2-Spezies wird durch die starke  $\nu(\text{CO})$ -Bande bei 1938  $\text{cm}^{-1}$  deutlich. Die zugehörigen CN-Streckschwingungen sind jedoch aufgrund von Überlagerungen nicht zuzuordnen. Eine langsame  $\text{O}_2$ -Diffusion (ca. 21 h) in die IR-Messzelle führte zu einer deutlichen Abnahme aller reduzierten Spezies. Das Wiedererscheinen der Ni-Ox2-Spezies zeigt die Reversibilität der Prozesse (Abbildung 19F). Die Tabelle 7 zeigt eine Übersicht aller detektierten Redoxzustände der SH-Derivate im Vergleich zu denen anderer [NiFe]-Hydrogenasen. Die infrarotspektroskopischen Untersuchungen am HoxHY-Protein, an der gereinigten heterohexameren SH (Kapitel 3.2.6) und an der SH in ganzen Zellen (Kapitel 3.1.3) machen deutlich, dass die SH einen Standard-Satz von einem CO- und zwei CN-Liganden besitzt und



nicht wie zuvor angenommen fünf diatomaren Liganden aufweist. Des Weiteren wurde deutlich, dass FMN für die Reduktion durch  $H_2$  eine wichtige Rolle spielt.

### 3.4 Katalytische Eigenschaften des Diaphorase-Moduls

#### 3.4.1 Funktionalität eines plasmidbasierten Diaphorase-Moduls der SH

Im Folgenden sollte das Diaphorase-Modul, welches das Hydrogenase-Modul mit dem cytoplasmatischen  $NAD^+/NADH$ -Pool koppelt, näher untersucht werden, um dessen Kofaktoren, die Reversibilität, die ROS-Produktion sowie die  $O_2$ -Toleranz zu untersuchen. Für die Reinigung des Diaphorase-Moduls wurde eine ähnliche Strategie wie für das Hydrogenase-Modul verwendet. Für die homologe Überproduktion und anschließende Reinigung von HoxFU wurde ein Plasmid genutzt, welches das gesamte SH-Operon mit den Genen *hoxFUYHWHypA2B2F2CDEX* trägt.

**Tabelle 8: Funktionalität des auf pGE553 codierten Diaphorase-Moduls.** Die SH-Aktivitäten von mit CTAB permeabilisierten Zellen verschiedener *R. eutropha*-Derivate wurden gemessen, die zuvor in FGN-Medium angezogen worden waren.

<i>R. eutropha</i>	Relevante	
Stamm	Eigenschaften	SH-Aktivität [ $U \times mg^{-1}$ ] <sup>a</sup>
HF798	$SH^+$	$5,7 \pm 1,0$
HF903	$SH^- (\Delta hoxFU)$	$< 0,001$
HF903 (pGE553)	$SH^+ (hox_{Strep}FU)$	$2,8 \pm 0,2$

<sup>a</sup> Die  $H_2$ -vermittelte Reduktion von  $NAD^+$  wurde photometrisch verfolgt.

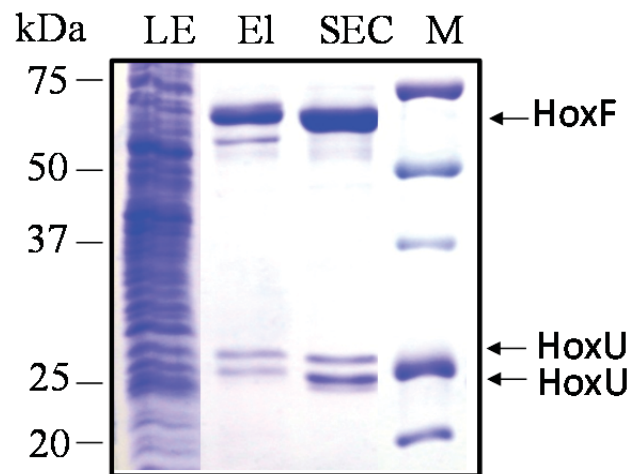
Von diesem Plasmid wurden die Gene *hoxY* und *H*, die für das Hydrogenase-Modul codieren, deletiert und das 5'-Ende von *hoxF* wurde mit einer den *Strep-tag-II*-kodierenden Sequenz ausgestattet. Um zu testen, ob das resultierende Plasmid pGE553 in der Lage ist, funktionelles HoxFU-Protein zu produzieren, wurde es konjugativ in den Stamm *R. eutropha* HF903 übertragen, in dem sowohl *hoxF* als auch *hoxU* deletiert wurden. Die Tabelle 8 zeigt, dass der rekombinante Stamm in der Tat  $H_2$ -abhängige,  $NAD^+$ -reduzierende Aktivität besaß. Die Beobachtung, dass nur etwa 50 % der Wildtyp-Aktivität erreicht wurden, kann dadurch erklärt werden, dass die *in-trans*-Komplementation eine räumliche Trennung der Synthese der Hydrogenase- und Diaphorase-Module mit sich bringt, die zu einer weniger effizienten Assemblierung beider Subkomplexe *in vivo* führt.

#### 3.4.2 Reinigung des Diaphorase-Moduls

Für die HoxFU-Reinigung wurde das Plasmid pGE553 in den Stamm *R. eutropha* HF424 transferiert, der die MBH und die SH nicht synthetisieren kann (Massanz *et al.* 1998). Die resultierende Transkonjugante wurde in Standard-FGN-Minimalmedium bis in die späte



stationäre Phase kultiviert. Das HoxFU-Heterodimer wurde aus dem löslichen Zellextrakt durch *Strep*-Tactin Affinitäts- und anschließende Größenausschlusschromatographie gereinigt. Der zweite Reinigungsschritt war notwendig, um eine inaktive HoxFU-Spezies mit geringerer Größe von ca 90 kDa und ein nicht mit HoxFU assoziiertes Protein von etwa 60 kDa zu entfernen (Abbildung 20). Die Größenbestimmung mittels Größenausschlusschromatographie ergab eine molekulare Masse von 110 kDa. Aus 32 g Zellen (Nassgewicht) wurden routinemäßig 0,5 mg HoxFU mit Aktivitäten (NADH: BV) von bis zu 350 U/mg gereinigt. Die Anzucht in FGN\*-Medium führte zu keiner Steigerung der Aktivität und Ausbeute.



**Abb. 20: Reinigung des HoxFU-Moduls aus *R. eutropha* HF424.** Löslicher Extrakt (LE; 20 µg), gereinigtes Protein nach *Strep*-Tactin Affinitätschromatographie (EI; 3 µg) und anschließender Größenausschlusschromatographie (SEC, 3 µg) wurden mittels SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie Blau angefärbt. Die Größen eines Standard-Protein-Markers sind in Spur M in kDa angegeben. Pfeile deuten auf die Laufhöhen von HoxF (67 kDa) und zwei Unterformen des HoxU-Proteins (27 und 23 kDa).

Um HoxFU ohne den Einfluss von HoxI zu untersuchen, wurde während des Reinigungsprozesses eine höhere Ionenstärke (150 mM KCl) und leicht alkalischen Bedingungen (pH 8,0) eingesetzt, was zur Dissoziation von HoxI aus dem Komplex führt (Burgdorf *et al.* 2005). Die SDS-PAGE-Analyse bestätigte, dass im gereinigten HoxFU-Protein keine signifikanten HoxI-Anteile vorhanden waren (Abbildung 20). Die beiden Proteinbanden mit apparenten molaren Massen von ca. 23 und 27 kDa konnten mittels „*Peptide Mass Fingerprinting*“ eindeutig der HoxU-Untereinheit zugeordnet werden (Abbildung 20, Tabelle 9). Dabei enthielten beide Subformen die N- und C-Termini des reifen Proteins. Dies schloss Proteolyse als Grund für die unterschiedlichen elektrophoretischen Wanderungseigenschaften aus und deutete auf eine noch nicht identifizierte Protein-Modifikation hin.

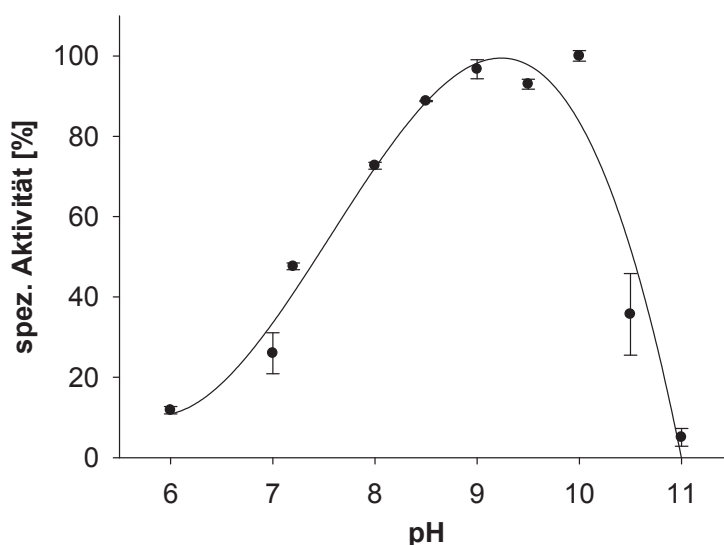
**Tabelle 9: Ergebnisse der “Peptide mass fingerprinting”-Analyse des gereinigten HoxFU-Komplexes.**

Probe	Protein	“Score“ von PETIDEMAP	gefundene Peptide	Identifikation als	Abdeckung (%)
Gesamtprotein nach Größenausschlusschromatographie	1	24,42	11	HoxF	14
Proteinbande bei 27 kDa	2	12,59	6	HoxU	24
Proteinbande bei 23 kDa	1	97,85	14	HoxU	61
Proteinbande bei 23 kDa	1	151,59	18	HoxU	67

<sup>a</sup>Coomassieblau-gefärbtes Protein wurde aus einem Acrylamid-Gel ausgeschnitten und mit Trypsin nach Angaben des Herstellers verdaut (Promega, Mannheim, Deutschland). In Zusammenarbeit mit Anne Pohlmann wurden die Peptide mit einem Flüssigkeitschromatographen, der mit einer Elektrospray-Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometer gekoppelt war, getrennt und der *m/z*-Wert bestimmt. Das Programm PEPTIDEMAP der Software PROWL (<http://prowl.rockefeller.edu>) wurde verwendet, um experimentell ermittelte Massen mit *in silico* berechneten Massen mit einer minimalen Genauigkeit von 0,05 Da zu vergleichen, wobei eine fehlende Spaltstelle erlaubt wurde.

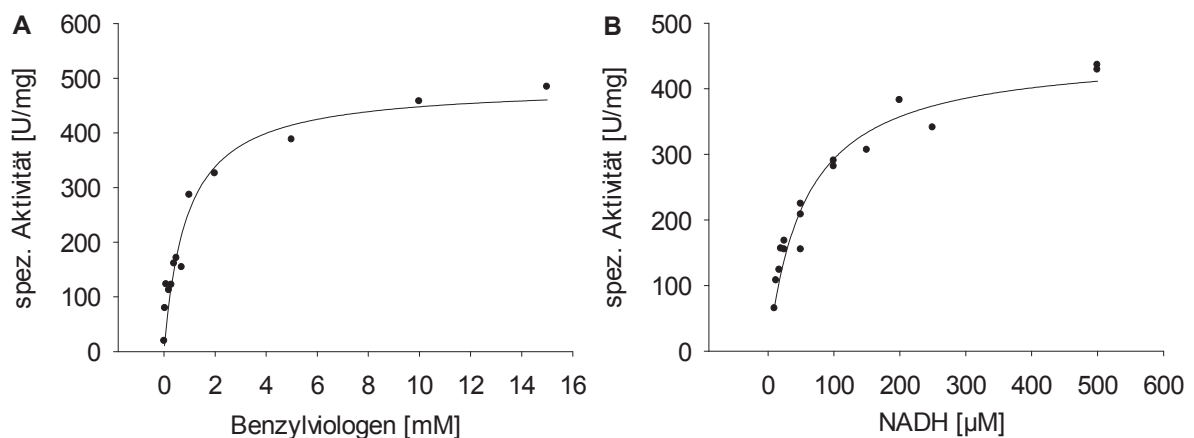
### 3.4.3 Biochemische Charakterisierung des HoxFU-Moduls

Mit dem gereinigtem HoxFU wurden biochemische, spektroskopische und elektrochemische Untersuchungen durchgeführt, um die NADH:Akzeptor-Oxidoreduktase-Aktivität dieses Enzyms näher zu charakterisieren. Die NADH:Benzyliologen(BV)-Oxidoreduktase-Aktivität des gereinigten HoxFU-Proteins wurde bei pH-Werten zwischen 6 und 11 bestimmt (Abbildung 21). Die maximale Aktivität wurde bei pH 10 erreicht. Das pH-Optimum der H<sub>2</sub>-abhängigen NAD<sup>+</sup>-Reduktion durch die native SH liegt dagegen bei einem pH-Wert von 8,0 (Schneider und Schlegel 1976). Jedoch sinkt bei pH 10 die HoxFU-vermittelte NADH-Oxidation nach etwa 30 s deutlich, was auf Protein-Instabilität bei diesem nichtphysiologischen pH-Wert hindeutet (Abbildung 21).



**Abb. 21: Bestimmung des pH-Optimums für die NADH-vermittelte Reduktion von Benzyliologen durch HoxFU.** Die höchste spezifische Aktivität (297 U/mg) wurde bei pH 10 beobachtet und ist auf 100% gesetzt.

Um die biochemischen Eigenschaften von HoxFU mit denen der nativen SH und Komplex I zu vergleichen, wurden alle nachfolgenden kinetischen Untersuchungen bei pH 8,0 durchgeführt. Für den künstlichen Elektronenakzeptor BV wurde eine Michaelis-Menten-Konstante ( $K_M$ ) von 882  $\mu\text{M}$  bestimmt (Abbildung 22A). Die HoxFU-vermittelte Umsatzrate für die NADH-abhängige BV-Reduktion betrug  $639 \text{ s}^{-1}$ , wobei der  $K_M$  Wert für NADH bei 56  $\mu\text{M}$  lag (Abbildung 22B). Aufgrund der vergleichbaren Umsatzraten und  $K_M$ -Werte von HoxFU und der nativen SH kann davon ausgegangen werden, dass das aktive Zentrum des Diaphorase-Dimers nicht durch das Entfernen des Hydrogenase-Moduls in Mitleidenschaft gezogen wurde (Schneider und Schlegel 1976).



**Abb. 22: Kinetik der Benzylviologen-Reduktion durch HoxFU mit NADH als Elektronendonator.** Die NADH-abhängige BV-Reduktionsaktivität wurde für variierende BV- und NADH-Konzentrationen (A bzw. B) bestimmt. Der  $K_M$ -Wert wurde durch nicht-lineare Regression ( $R^2 = 0,949$  für A bzw.  $R^2 = 0,945$  für B) bestimmt.

Eine fünfzehnminütige Vorinkubation von HoxFU mit NADH in Konzentrationen, die über dem  $K_M$ -Wert lagen, führte zu einer signifikanten Abnahme der Aktivität (Tabelle 10). Dies lässt sich mit der Freisetzung des HoxFU-gebundenen Flavins erklären, das mittels Fluoreszenzspektroskopie im Überstand detektiert wurde (Tabelle 10). Die minimale FMN-Freisetzung in Abwesenheit von NADH ist wahrscheinlich auf die mechanische Beanspruchung und Temperatur-Änderungen im Zuge der Enzymbehandlung zurückzuführen. Ein Überschuss an freiem FMN im Test verhinderte die Inaktivierung und erhöhte sogar die Aktivität des HoxFU-Moduls. Ein ähnlicher Effekt wurde zuvor für die native SH beobachtet (Schneider und Schlegel 1976; van der Linden *et al.* 2004).

**Tabelle 10: Einfluss verschiedener NADH-Konzentrationen auf die Aktivität und FMN-Verlust des HoxFU-Moduls.**

NADH [ $\mu$ M]	FMN-Freisetzung <sup>b</sup> [%]	Spezifische Aktivität [U/ mg] <sup>a</sup>	
		- FMN	+ FMN
0	16 $\pm$ 2	294 $\pm$ 8	356 $\pm$ 0
25	29 $\pm$ 3	297 $\pm$ 41	371 $\pm$ 6
100	62 $\pm$ 3	138 $\pm$ 35	356 $\pm$ 22
500	96 $\pm$ 4	59 $\pm$ 10	246 $\pm$ 41

<sup>a</sup> Gereinigtes HoxFU wurde mit verschiedenen NADH-Konzentrationen in der Gegenwart (500  $\mu$ M) und Abwesenheit von exogenem FMN inkubiert. Nach 15 min wurde Benzylviologen hinzugefügt und die spezifische NADH: BV-Aktivität bestimmt. <sup>b</sup> Die Freisetzung von FMN aus dem HoxFU-Modul (ohne Zugabe von exogenem FMN) wurde durch Analyse des HoxFU-Filtrats (Konzentrator mit 3 kD Größenausschlussgrenze, Millipore, Bedford, MA, USA, 4 °C, 7 min bei 14000 x g) mittels Fluoreszenzspektroskopie bestimmt.

#### 3.4.4 Kofaktor-Analyse des HoxFU-Moduls

Mittels Fluoreszenzspektroskopie wurde ein FMN-Gehalt  $0,85 \pm 0,05$  pro HoxFU-Heterodimer bestimmt. Das im Diaphorase-Modul gebundene FMN zeigte die typischen Anregungs- und Emissionsspektren (Abbildung S9, S10; Schneider und Schlegel 1976). Der N-terminale Teil von HoxF zeigt Ähnlichkeiten zu HoxE von bidirektionalen Hydrogenasen aus Cyanobakterien und zur Nqo2-Untereinheit von Komplex I. Der C-terminale Teil von HoxF ist dagegen homolog zu cyanobakteriellen HoxF-Proteinen und der Nqo1-Untereinheit aus Komplex I (Abbildung 23, 24). Diese „Zweiteiligkeit“ lässt vermuten, dass HoxF aus *R. eutropha* ein Fusionsprotein aus zwei Untereinheiten von Komplex I darstellt. Die Abwesenheit von zwei Cysteinresten, die in der Koordination des [2Fe2S]-Clusters in Nqo2 involviert sind, legt nahe, dass HoxF von *R. eutropha* keinen [2Fe2S]-Cluster enthält (Abbildung 23).

Durch induktiv gekoppelte Plasma-Emissionsspektrometrie (ICP-OES inductively coupled plasma optical emission spectrometry) wurden  $12 \pm 1$  Eisenionen pro FMN-Molekül nachgewiesen. Dieser Wert passt gut zu den 14 Eisenatomen, die auf der Basis konservierter Reste, die [Fe-S]-Cluster koordinieren können, vorhergesagt wird (Abbildung 23-25).

<i>T.th.</i> Nqo2	-----MGFFDDKQDFLEETFAKYPPEGRRAAIMPLRRVQQE	37
<i>R.e.</i> NuoE	-----MTMLSAAELKEIDRAIAKYPADQKQSAVMAALAVAQGE	38
<i>Synco.</i> HoxE	MSFET--ITMAISHAVP-ADKRFRVLEVAMKRNQYRQDTLIEILHKAQEV	47
<i>Synco.</i> HoxE	MTVATDRQTVPPSAAHPSGDKRKFVLDATMKRNQFNQDALIEILHKAQEI	50
<i>T.r.</i> Hox1E	MSLQQ-----AKPPLPSDDKRWKLVNATMRRNGYAGHALIETLHVSQDA	44
<i>R.o.</i> HoxF	-----MSGDIKAILE-----RNGSERTRLIDILWDVQHL	29
<i>R.e.</i> HoxF	-----MDSRITTILE-----RYRSDRTRLIDILWDVQHE	29
<i>T.r.</i> Hox2F	-----MNASATVTVEGFVAESLATHGRDPRHLLQHLIRVQQR	37
	* *	
<i>T.th.</i> Nqo2	EGWIRPERIEEIIARLVGTTPTTEVMGVASFYSYYQFVPTGKYHLQVCATLS	87
<i>R.e.</i> NuoE	VGWVSPPEVMQFVASYLEMPPVWVEEVATFYNNMYDTKPVGKFKLAVCTNLP	88
<i>Synco.</i> HoxE	FGYLEDEVLEYVARGLKLPLSRVYG VATFYHLFSLKPKGKHTCVVCLGTA	97
<i>Synco.</i> HoxE	FGYLEEDVLLYVARGLKLPLSRVFGVATFYHLFSLKPSGKHTCVVCLGTA	100
<i>T.r.</i> Hox1E	FGFLDEGSLRFVASSLDLPLSKVYG VATFYHLFALKPKGRHACVVCCTGTA	94
<i>R.o.</i> HoxF	YGHIPDEVLPQLADELNLSPDLILETASFYHFFHRKPSGKYRIYLSDTVI	79
<i>R.e.</i> HoxF	YGHIPDAVLPQLGAGLKLSPDLIRETASFYHFFLDKPSGKYRIYLCNSVI	79
<i>T.r.</i> Hox2F	FSYVPDAAVEALSVALDVTRTQVRAAIAFYAFLHDRPRGAFEIRFSDNIT	87
	** * *	
<i>T.th.</i> Nqo2	CKLAGAEELWDYLTETLGIG-----PGEVTPDGLFSVQKVBCLGSCHTA	131
<i>R.e.</i> NuoE	CALSGGERAGEYLKRKLIGID-----YNETTADGCFTLKEGECMGAQGGDA	132
<i>Synco.</i> HoxE	CYVKGSGELLDKIDETLHIK-----PGETTPDDQISLVTARCI GACGIA	141
<i>Synco.</i> HoxE	CYVKGAGDLLKTLDEQVHLK-----PGETTEDGQMSLV TARCIGACGIA	144
<i>T.r.</i> Hox1E	CYIKGAGGLVERLQERYDIN-----PGETTEDDRLSLLTARCVGACGLA	138
<i>R.o.</i> HoxF	AKMNGYQAVHDSLERETGAR----FG--GTDKTGMFGLFETPCIGLSDQE	123
<i>R.e.</i> HoxF	AKINGYQAVREALERETGIR----FG--ETDPNGMFGFLDTPCIGLSDQE	123
<i>T.r.</i> Hox2F	DRMLGSRRLIRLLIERLGLTGLPAWGRDLVRPDGRASVGLASCTGMCDQG	137
	* *	
<i>T.th.</i> Nqo2	PVIQVNDEPYVECVTRARLEALLAGLRAGKRLEEIELPGKCGHHVHEVEV	181
<i>R.e.</i> NuoE	PVMIVNNTRMCSFMSDDKLDALVDELKA-----EAAKGKK-----	167
<i>Synco.</i> HoxE	PAVVYDDEVCGKQNADHLMARLRQLSEGS-----	170
<i>Synco.</i> HoxE	PAVVYDGKVLGKQNDEAVLAAIQPWLSNS-----	173
<i>T.r.</i> Hox1E	PAIVIDGDVLGKLDSESLIAKLEELT-----	164
<i>R.o.</i> HoxF	PAMLIDNVVFTRLRPGTIVDIITQLRQGRSPEDIANPAGLPSDDVAYVDG	173
<i>R.e.</i> HoxF	PAMLIDKVVFTRLRPGKITDIIAQLKQGRSPA EIANPAGLPSQDIAYVDA	173
<i>T.r.</i> Hox2F	PALLVNGQAVTNLDAQRVDRDIADLVQEG-----IPLERWPGEFF	176
	*	

**Abb. 23: Multipler Sequenzvergleich des N-terminalen Teils von HoxF aus *R. eutropha* mit Untereinheiten aus verwandten Hydrogenasen und der Komplex I-Untereinheit NuoE aus *R. eutropha* und Nqo2 aus *T. thermophilus*.** Cysteinreste involviert in der Koordination des [2Fe2S]-Clusters in Nqo2 sind durch schwarze Kästen angegeben (Sazanov und Hinchliffe 2006). Abkürzungen: *R.e.*, *Ralstonia eutropha*, *R.o.*, *Rhodococcus opacus*, *T.r.*, *Thiocapsa roseopersicina*; *Synco.*, *Synechocystis* PCC 6803; *Synco.*, *Synechococcus* PCC 7002; *T.th.*, *Thermus thermophilus*. Aminosäurereste, die in allen Proteinen konserviert sind, sind mit einem \* gekennzeichnet.

T.r. Hox1F KIVLENAGIIDPDSFKGYVAVGGYSALIRALSEMTP---ADVLEVTDSGLRGRGGGGYP 180  
 Al.v. HoxF RIVLEHSGLIDPDLSRGYIAVGGYAAALVRALTEMT---ADVLEVTTSGLRGRGGGGYP 181  
 Synco. HoxF PVLVLENSGKIDPERIEAYIARGGYRSLHQVLEDLTP---MAVVEEITQSGLRGRGGGGYP 176  
 Syncy. HoxF NIALENSGRIDPESIDEYIALGGYEQHLKVVYEMTP---EEVIVEMNKSGLRGRGGGGYP 178  
 An.v. HoxF PIVLENSGKIDPERIQAYIAAQGYQALYQVLEMT---AGVVDVSVNRSGLRGRGGAGYP 180  
 R.e. FdsB RLTFARVGITDPLSLDDYRAHEGFAGLERAL-AMQP---AEIVQEVTDSGLRGRGGGAFF 161  
 R.e. Nuof QPLILAGLDGKNWHLLEDYVVRGGYQQLKRILTEKIPP--EQVIADVKAASGLRGRGGAGFP 67  
 T.th. Nqol RTLYAHVHGKESWTLDDYYLRHGGYETAKRVLKEKTP---DEVIEEVKRSGLRGRGGAGFP 71  
 R.e. HoxF DIAYVDAMVESNVRTKGPVFFRGRDRLSLDDQCLLLKPEQVIETIVDSRLRGRGGAGFS 226  
 R.o. HoxF DVAYVDGVVESNVRTKGPVFFRGLTDYGRLLLELCLALRPEQIIDRIIESKLRGRGGAGFS 226  
 T.r. Hox2F RWPGEFFRVENNIRRRGLLGNPATDG-AAVRRLDAGAEAAALAEVERSGLRGRGGAGFT 228  
 \* \* \* \* \*

T.r. Hox1F TGLKWSTVAKMPATQKYVICNADEGDPGAFMDRAILES DPHRVLEGMAIAAYAIGANKAY 240  
 Al.v. HoxF TGLKWSTIAKMPGQKYVVCNADEGDPGAFMDRAVLES DPHRVLEGMAIAAYAVGASKGY 241  
 Synco. HoxF TGLKWATVAKMPGQKYVVCNADEGDPGAFMDRAVLES DPHRVLEGMAIAGYAVGANHGYP 236  
 Syncy. HoxF TGLKWATVAKMPGQKYVICNADEGDPGAFMDRSVLES DPHRVLEGMAIAAYAVGANHGYP 238  
 An.v. HoxF TGLKWATVAKAKGERKFVICNADEGDPGAFMDRSVLES DPHRVLEGMAIAAYAVGASQGY 240  
 R.e. FdsB TGIKWKTVLGAQSAVKYIVCNADEGSGTFSDRMVMEDDPFMLIEGMTAIALAVGAEGGY 221  
 R.e. Nuof TGLKWSFMPRTFPGQKYLVCNTDEGEPTGFKDRDIIRYNPHSLIEGMAIAGYAMGITVGY 127  
 T.th. Nqol TGLKWSFMPKDDGQHYLICNADESEPGSKDRYILEDVPHLLIEGMILAGYAIRATVGY 131  
 R.e. HoxF TGLKWRLCRDAESEQKYVICNADEGEPTGFKDRVLLTRAPKKVVFVGMVIAAYAIGCRKGI 286  
 R.o. HoxF TGLKWLQLCRTAVSDDKYIICNADEGEPTGFKDRVLLTRSPKKVFMGMIIAARAIGSRNGI 286  
 T.r. Hox2F TALKWRFRCREAPGTDRYVVCNADEGEPTGFKDRVLLTDYTDLVIEGMTVCAGVIGARRGF 288  
 \* \* \* \* \*

T.r. Hox1F VYVRAEYPLAVERLQTAIRKAKRSGLLGKIGD-TQFSLEVEIRLGAGAFVCGEETALMA 299  
 Al.v. HoxF VYVRAEYPLAVERLETAIRKAKRAGFLGAKVAD-TQFAFEVEIRLGAGAFVCGEETALMA 300  
 Synco. HoxF IYIRAHEYPLAIQRLKAIKQAKSKGLLGSQIFN-SPFNFITIDIRIGAGAFVCGEETALIA 295  
 Syncy. HoxF IYVRAEYPLAIQRLQKAIQAKRYGLMGTQIFD-SPIDFKIDIRVAGAFVCGEETALIA 297  
 An.v. HoxF IYVRAEYPLAIKRLQTAIHQAQRLGLLGSNIFE-SPFDFKIDIRIGAGAYVCGEETALMA 299  
 R.e. FdsB IYCRSEYPHAIIVLESAGIANAAGWLGDDIRG-SGKRFHLEVRKAGAYVCGEETALLE 280  
 R.e. Nuof NYIHGEIWNKYIFEEALEEARAAGFLGDNILG-SGFDFQLHAHHGYGAYICGEETALLE 186  
 T.th. Nqol IYVRGEYRRAADRLQAIKEARAGYLGKNLFG-TDFSFDLHVHRGAGAYICGEETALMN 190  
 R.e. HoxF VYLRGEYFLKDYLERQLQELRDEGLLGARIGGQSGFDFDIRIQMGAGAYICGEDESALIE 346  
 R.o. HoxF LYLRWEYIYILKDYLERQLQELRDEGLLGARIGGQSGFDFDIRIQMGAGAYICGEDESALIE 346  
 T.r. Hox2F LYLRGEYRYLLPHLESVLQRRRAEGLLGLTRILGADGFDFDIEIHLGAGAYICGEDESALIE 348  
 \* \* \* \* \*

T.r. Hox1F SIEGLRGQPRPRPPYPAEAGLWGYP TLINNVETFANIAPIVREGGDWFASIGTERSKGTK 359  
 Al.v. HoxF SIEGLRGQPRPRPPYPAESGLWGCP TLINNVETFANIAPIIREGGDWFASIGTERSKGTK 360  
 Synco. HoxF SIEGGRGTPRPRPPYPAQSGLWGHT TLINNVETYANIVPIIREGGDWFSSIGTERSKGTK 355  
 Syncy. HoxF SVEGKRGTPRPRPPYPAQSGLWQSPT TLINNVETYANVPIIREGGDWYGSIGTERSKGTK 357  
 An.v. HoxF SIEGKRGVPHPRPPYPAESGLWGYP TLINNVETFANIAPIIRKGDWYGSIGTERSKGTK 359  
 R.e. FdsB SLEGRRGVVRAPKPLPALQGLFGKPTVINNVISLATVPVILARGAQYRDYGMGRSRGTL 340  
 R.e. Nuof SLEGGKGGPRFKPPFPASGLYGP TTTINNTETFAAVPFLAVGPENYLLKLGKPNNGGTK 246  
 T.th. Nqol SLEGLRANPRLKPPFPASGLWGKPT TTTINNVETLASVVPIMERGADWFAQMGTEQSKGMK 250  
 R.e. HoxF SCEGKRGTPRVKPPFPVQGYLGKPT SVNNVETFAAVSRIMEEGADWFRAMGTPDSAGTR 406  
 R.o. HoxF SCEGKRGTPRVKPPFPVQGYLGKPT CVNNVETFAAAARIMEEGPNWFRALGTPPESTGTR 406  
 T.r. Hox2F SLEGKRGVTRKPPFPVTSGFDDQPTVNNVETFLAAARVQWGGYWLREGGTDQSAGSK 408  
 \* \* \* \* \*

T.r. Hox1F VFALAGTITNTGLIEVPMGTSLRDIIEVIGGGIPGGKAFKAVQTGGPSGGCIPA--QHLD 417  
 Al.v. HoxF VFALAGKIKNTGLIEVPMGTSLRDIIEVIGGGIPDGRAFKAVQTGGPSGGCIPR--RHLD 418  
 Synco. HoxF VFALTGKVKNNGLIEVPMGTTPVRQIVEQMGGGIPDSGT VKSVQTGGPSGGCIPA--DYLD 413  
 Syncy. HoxF VFALTGKVENAGLIEVPMGTTPVRQIVEQMGGGVPNGGQVKAVQTGGPSGGCIPA--DKLD 415  
 An.v. HoxF VFALAGKIRNTGLIEVPMGTSLRQIVEQMGGGIPDGGVAKAVQTGGPSGGCIPA--SAFD 417  
 R.e. FdsB PFQLAGNIKQGGVLEKAFGVT LRELLVDYGGGTRSGRAIRAVQVGGPLGAYLPE--SRFD 398  
 R.e. Nuof IFSISGDVERPGNYEIP LGTFFAKLL-ELAGGMRGKKRIKAVIPGGSSAPVVPVPG-DLMMA 304  
 T.th. Nqol LYQISGPVKRPGVYELPMGTTFRELIYEWAGGP--LEPIQAIIPGSSSTPLPFTTEEVLD 308  
 R.e. HoxF LLSVAGDCSKPGIYEVWGVTLNEVLAMVG-----ARDARAVQISGPSG-----ECVS 454  
 R.o. HoxF LLSVAGDCSRPGIYEVWGVTLNEVLTTVG-----ARDARAVQISGPSG-----QCVS 454  
 T.r. Hox2F ILSVSGDCARPGEIYEPFGTVPVHQLVSDCG-----AENTQAVQISGAAG-----ATLS 456  
 \* \* \* \* \*

T.r. Hox1F IAVDYDSLKTGLTMMGSGGMIVMDETSSMVDVARYFMEFCMTESCGKCIPTORTG-TQQMH 476  
 Al.v. HoxF IVPDYDSLKTGLTMMGSGGLIVMDETSCMVDVAR-FMEFCMSSESCGKCIPTORAG-TWQMH 476  
 Synco. HoxF TPIEYDSLTKLGTMMGSGGMIVMDEATNMVDVAKFYMEFCQCESCGKCIPTORAG-TVQMS 472  
 Syncy. HoxF TPIEYDTLLALGTMMGSGGMIVMDESTNMVDVAQFYMDFCCKSESCGKCIPTORAG-TVQLY 474  
 An.v. HoxF TPVDYESLTNLGSMGSGGMIVMDDTTNMVDVARFMEFCMDES CGKCIPTORVG-TVQLH 476  
 R.e. FdsB VPLDYEAYAAFGGVVGHGGIVVFDETVDMAKQARYAMEFCAIESCGKCTPOTRIG-STRGV 457  
 R.e. Nuof SDMDYDSIAKAGSMLGSGAVIVMDETRCMVRSLLRLSYFYFEESCGQCTPOTREG-TGWLY 363  
 T.th. Nqol TPMSYEHLOAKGSM LGTGGVILIPERVSMVDAMWNLTRFYAHESCGKCTPOTREGVAGFMV 368  
 R.e. HoxF VAKDGERKLAYEDLSCNGAFTIFNCKRDLLEIVRDHMQFFVEESCGICVPTORAG-NVDLH 513  
 R.o. HoxF VAEDGERRMAYEDLSCNGAFTIFNTERDLLEIVKDFMQFFVDES CGICVPTORVG-NIDLH 513  
 T.r. Hox2F PA-DFDRIIAFEDLPTAGSFMIFDHSRDLDMVRNFAAFFAHESCGFCTPOTRVG-GALLR 514  
 \* \* \* \* \*



```

T.r. Hox1F      SILDLRAKSQATRAELTLEELCEVVQATSLCGLGQTAPNPVLSTMRFRDEYEAKLGEV 536
Al.v. HoxF      ALLDTLTKAEGTRADLALLEDLCDVVRATSLCGLGQTAPNPVLSTLRYFRDEYEAKLGEV 536
Synco. HoxF     GLLSKMLKGQAEPKDIELLEQLCHMVKEASLCGLGQSAPNPILSTLRYFRAEYDALVGSN 532
Synco. HoxF     DLLTRFLEGEATQEDLIKLENLCHMVKETSLSGLGMSAPNPVISTLRYFRHEYEELLKV- 533
An.v. HoxF      GLLSKIREGKASFADLELEELCDMVKNTSLSGLGQSAPNPVISTLRYFRDEYLALIAE- 535
R.e. FdsB       EVMDRIIAGEQPVKHVALVRDLCDTMLNGSLCAMGGMTPYPVLSALNEFFEDFGLASNPA 517
R.e. NuoF       RMVNRIEHGEGRQEDLDLLNNVAENIMGRTICALGDAAAMPVRGMLKHYWKEFEYHVEHK 423
T.th. Nqo1      NLFAKIGTGQGEKDVENLEALLPLIEGRSFCPLADAAVWPVKGLSRHFKDQYLALAREK 428
R.e. HoxF       RKVEWVIAGKACQKDLDDMVSWGALVRRTSRCGLGATSPKPILTLEKFEIYQNKLVRH 573
R.o. HoxF       KKVELVIAGKACQKDLDDVSVWGALVKKTSRCGLGATSPNPILTLDKFEIYTKRLRKQ 573
T.r. Hox2F      NLVEKVAAGQGSEYDLSEMRRIQTMVRRASYCGLGHTAPNHVVNTLDKFLIYGRRLARA 574

```

```

T.r.Hox1F      -----
Al.v.HoxF      TA----- 538
Synco.HoxF     AD----- 534
Synco.HoxF     -----
An.v.HoxF      -----
R.e.FdsB       KAA----- 520
R.e.NuoF       QCMVPAYI----- 431
T.th.Nqo1      RPVPRPSLWR----- 438
R.e.HoxF       EG-PLLPSFDLDTALGGYEKALKDLEEVTR----- 602
R.o.HoxF       KKEALLLSFDLDAALGGYEKALEGLAKEEIK----- 604
T.r.Hox2F      SH---TPSFDLDAALS-QARALTGRDDIGAHIGDGEVSA 610

```

**Abb. 24: Multipler Sequenzvergleich des C-terminalen Teils von HoxF aus *R. eutropha* mit Untereinheiten aus verwandten Hydrogenasen, mit der FdsB Untereinheit der NAD<sup>+</sup>-abhängigen Formiat-Dehydrogenase aus *R. eutropha* und den Komplex I-Untereinheiten NuoF aus *R. eutropha* und Nqo1 aus *T. thermophilus*.** Konservierte Cysteinreste, die in der Koordination des [4Fe4S]-Clusters in Nqo1 von *T. thermophilus* und in allen anderen Proteinen beteiligt sind, sind schwarz eingerahmt. Für die Bindestellenumwandlung zu NADP<sup>+</sup> wurden die blau und rot hervorgehobenen Aminosäuren ausgetauscht. Aspartat (D340) und Glutamat (E341) (blau umrahmt) bilden vermutlich Wasserstoffbrücken zu der Ribose der Adenosin-Einheit des NADs aus, an der sich bei NADPH eine zusätzliche Phosphatgruppe befindet (Sazanov und Hinchliffe 2006). Zudem wurden zwei fernab der NAD-Bindestelle exponierte Aspartate durch Serin (D467S) und Lysin (D401K) ersetzt, wie sie in bidirektionalen Hydrogenasen aus Cyanobakterien vorgefunden werden (grün). Abkürzungen: *Re*, *Ralstonia eutropha*; *Ro*, *Rhodococcus opacus*; *Tr*, *Thiocapsa roseopersicina*; *Synco*, *Synechocystis* PCC 6803; *Synco*, *Synechococcus* PCC 7002; *T.th.*, *Thermus thermophilus*; *Al.v* *Allochrotrium vinosum*; *An.v.* *Anabaena variabilis* ATCC 29413. Aminosäurereste, die in allen Proteinen konserviert sind, sind mit einem \* gekennzeichnet.

```

R.e. HoxU      -----MSIQITIDGKTLTTEEGRTLVDVAAENGVIPT 33
R.o. HoxU      -----MSIEIEIDGVTVTTEESRTLVDVAAEAGVIPT 33
T.r. Hox2U     -----MSKTFKLDGREIPFETGQTIMDAALAAGVYIPH 33
Synco. HoxU    -----MAVKTLTINDQLISARAGETILEAARDAGIHIPT 34
Synco. HoxU    -----MSVVTLTIDDKAIAIEEGASILQAAGEAGVPIPT 34
T.r. Hox1U     -----MPLPAKQPNVRVVTNLNIDGRDLSAREDETIIEVCRENQIPIPS 43
R.e. FdsA      MNARNEIDFGTPASPSTELVTLEVDGVSVPAGTSVMRAAMEAQIAPVK 50
T.th. Nqo3     -----MVRVKVNDRIEVEPPGTSVMDAVFHAGYDVPL 32
R.e. NuoG      -----MVELEIDGKKVEVAEGSLVMEAAARKLGTIYIPH 32

```

```

R.e. HoxU      LCYLKDKPCLGTCRVCSVKVNGN-----VAAA 60
R.o. HoxU      LCYLKGKPSLGTGRVCSVKLNGT-----VVAA 60
T.r. Hox2U     LCHNPEFAPHGSCRVCVVDIGGR-----QVSA 60
Synco. HoxU    LCHLEGVSDVGAACRLCLVEIEGSNK-----LQPA 63
Synco. HoxU    LCHLEGISEAAACRLCMVEVEGTNK-----LMPA 63
T.r. Hox1U     LCYLEGLSVWGAACRLCLVELSGQGR-----LLAA 72
R.e. FdsA      LCATDSLNRNFGSCLCLVEIEGRRG-----YPAS 79
T.th. Nqo3     FCSEKHLSPIGAARMCLVRIGLPKKGPDGKPLLNEKGEPEIQWQPKLAAS 82
R.e. NuoG      FCYHRKLSIAANCRMCLVEVEKAPK-----ALPA 61

```

```

R.e. HoxU      CTVRVSKGLNVEVNDPELVDMRKALVEFLFAEGNHNCPSEKSGRCQLQA 110
R.o. HoxU      CTIRVANGMKIEVDEPEVDMRKANVELLFAEGNHNCPSEKSGRCQLQA 110
T.r. Hox2U     CTAAASEGLEVDNSSEAIQETRRAILQMLFVEGNEHVCPAEKSAGCQLQA 110
Synco. HoxU    CVTEVMMEGMVVQTHTEKLEERYRMTVELLFAEGNHNCAVGVANGNCELQD 113
Synco. HoxU    CVTAVSEEMVHNTTEKLQNYRRMTVELLSEGNHVCATGVANGNCELQD 113
T.r. Hox1U     CSTRVTEGMQIQNTTEKLQRYRRTIVELLFAERNHVCVGVSNHCELQH 122
R.e. FdsA      CTPPVEAGMKVKTQSDKLADLRGVMELYISDHPDCLTQPTNGNCELQD 129
T.th. Nqo3     CVTAVADGMVVDTLSDVVREAQAGMVEFTLLNHPDCLTQDKGGACELQD 132
R.e. NuoG      CATPVTPGMKVFTNSEKAVKAQKSVMEFLINHPDCLTQDQGGECQLQD 111

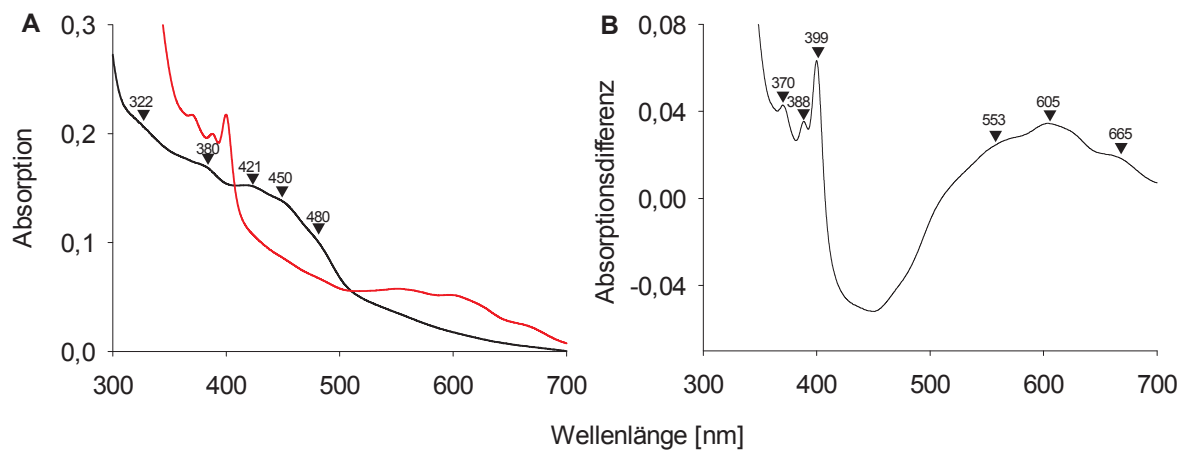
```



<i>R.e.</i> HoxU	VGYEVDMMVSRFPYRFPVRV-----VDHASEKIWLDR	CI	146
<i>R.o.</i> HoxU	VGYEVDMMVSRFQYRFPERV-----QDHASETIWLDR	CI	146
<i>T.r.</i> Hox2U	VAYYTGMLAPHFTFFPRRS-----VDASHPDVVIDFN	CI	146
<i>Synco.</i> HoxU	MAVEVGMDHSRFPYQPKRE-----VDISHKQFGIDHN	CI	149
<i>Synco.</i> HoxU	MAITVGMDHSRFPYQPKRE-----VDLSHPMFGIDHN	CI	149
<i>T.r.</i> Hox1U	MAQKCGVDHVRVPYRQASYP-----VDSSHEMFRDLHD	CI	158
<i>R.e.</i> FdsA	MAGVVGRLREVRYNDGGPERAPIATHQTQ-----KKDESNPYFTYDPSK	CI	174
<i>T.th.</i> Nqo3	RTVEYGLYEKKYQKGPLELPVYTRFEFTRRHVDKHHPLSPFVILDR	CI	182
<i>R.e.</i> NuoG	LAVGYGASESRYKEEKRVVFH-----KNVGPLISMEEMTR	CI	148
		**	
<i>R.e.</i> HoxU	FCQRQVEFIRDKASGRKIFSISHRGPESEID--AELANAMPPEQVKEA		194
<i>R.o.</i> HoxU	FCQRQVEFVRDKATGKKIFSISNRGGDSRIEID--ADLANAMPPEQVREA		194
<i>T.r.</i> Hox2U	LCELCVRASRDHD-GKRVFAISGRGLESGLVIDSHSGLLDSSFAATDKA		195
<i>Synco.</i> HoxU	LCTRCVVRVC-DEIEGAHVVDVSNRGGESKIVSGLNQPWGAVDSCGKC		198
<i>Synco.</i> HoxU	LCTRCVVRVC-DEIEGAHVVDVAYRGAECKIVSGLNQPWGTVDACTSCGKC		198
<i>T.r.</i> Hox1U	LCTRCVVRVC-DEIEGAHTWDVMGRGSDCRVITDMAQPWGESDTCTSCGKC		207
<i>R.e.</i> FdsA	VCNRCVVRAC-EETQGTFTALTISGRGFDSRVSPGTSQSFMES-DCVSCGAC		222
<i>T.th.</i> Nqo3	HCKRCVRYF-EEVPGDEVLDIFIERG-----VHTFIGTMDFGLPSPGFSGNI		226
<i>R.e.</i> NuoG	HCTRCVVRFG-QEVAGVMELGMLGRGE---HSEITTFVGKTVDSLSGNM		193
	* ** *		
<i>R.e.</i> HoxU	VAICPVGTILE-----KRVGYDDPI		214
<i>R.o.</i> HoxU	VAICPVGTIIE-----KRVGYDDPI		214
<i>T.r.</i> Hox2U	AHVCPGTGAILP-----KGRGYETPI		215
<i>Synco.</i> HoxU	VDACTPGSIFR-----KGATVGSKL		218
<i>Synco.</i> HoxU	VDACTPGSIFH-----KGETTAEKI		218
<i>T.r.</i> Hox1U	VQVCPGTALVK-----QGTSGVMGV		227
<i>R.e.</i> FdsA	VQACPTATLTETSVIKFGQPSHSTVTTCAVCGVGCSFKAEMKGNKVVVMV		272
<i>T.th.</i> Nqo3	TDICPVGALLDLTAR-----FRARNWEMEE		251
<i>R.e.</i> NuoG	IDLCPVGALTSKPFR-----YSARTWELAR		218
	**		
<i>R.e.</i> HoxU	GRRK-----YEIQSVRAR--ALEGEDK-----		234
<i>R.o.</i> HoxU	GRRK-----YEIETVRAR--ALGGEEDK-----		234
<i>T.r.</i> Hox2U	GERL-----YDREPISIVGDVRAHEEEVV---		239
<i>Synco.</i> HoxU	GDR-----QKLEFLITARTKGWTR-----		238
<i>Synco.</i> HoxU	GDR-----RKVEFLATARKEKEWVR-----		238
<i>T.r.</i> Hox1U	KDQ-----HFLPILARRRHSQ-----		243
<i>R.e.</i> FdsA	PYKDGKANEHACVKGKRFAGYATHKDRILKPMIRAKITDPWREVSWEAA		322
<i>T.th.</i> Nqo3	TPPTCALCPVCGC-----ITADTRSGELLRIAREVPEVNEIWDICD		292
<i>R.e.</i> NuoG	RKSVSPHDGLGAN-----LVVQTKNQRMVRLPLENEDINECWISD		259

**Abb. 25: Multipler Sequenzvergleich von HoxU aus *R. eutropha* mit Untereinheiten aus verwandten Hydrogenasen und mit dem N-terminalen Teil der Komplex I-Untereinheiten NuoG aus *R. eutropha* und Nqo3 aus *T. thermophilus*, sowie mit der FdsA-Untereinheit der NAD<sup>+</sup>-reduzierenden Formiat-Dehydrogenase aus *R. eutropha*.** Cystein- und Histidinreste, die in der Koordination des [2Fe2S]-Clusters (schwarz) und den beiden [4Fe4S] Cluster (Rot und Blau) in Nqo3 beteiligt sind, sind hervorgehoben (Sazanov und Hinchliffe 2006). Abkürzungen: *R.e.*, *Ralstonia eutropha*, *R.o.*, *Rhodococcus opacus*, *T.r.*, *Thiocapsa roseopersicina*; *Synco.*, *Synechocystis* PCC 6803; *Synco.*, *Synechococcus* PCC 7002; *T.th.*, *Thermus thermophilus*. Aminosäurereste, die in allen Proteinen konserviert sind, sind mit einem \* gekennzeichnet.

Weiterhin wurden die Kofaktorenzusammensetzung und die Redoxeigenschaften des HoxFU-Proteins durch UV-Vis-Spektroskopie analysiert (Abbildung 26). Für frisch isoliertes HoxFU-Protein waren breite Schultern bei etwa 380 nm und 450 nm zu beobachten (Abbildung 26A), die dem oxidierten FMN zugeordnet werden können (Zhao *et al.* 2001; Kohlstadt *et al.* 2008). Zusätzliche Schultern bei 322/380 nm und 421/480 nm sind indikativ für das Vorhandensein von [2Fe-2S]- bzw. [4Fe-4S]-Clustern (Ragan *et al.* 1982; Lippard und Berg 1994; Braun *et al.* 1998). Auf Grundlage der UV-Vis-Analyse, der Kofaktorbestimmung sowie der Homologie zu den Nqo1-, Nqo2- und Nqo3-Untereinheiten von Komplex I aus *T. thermophilus* befinden sich im HoxFU-Modul sehr wahrscheinlich ein FMN-Molekül, ein [2Fe-2S]-Cluster und drei [4Fe4S]-Cluster.



**Abb. 26: UV-Vis-Spektren von isoliertem (*as isolated*) und reduziertem HoxFU.** A zeigt das Spektrum der unbehandelten (4,8  $\mu\text{M}$ ) sowie der mit Dithionit (330  $\mu\text{M}$ ) reduzierten Probe. Peaks und Schultern sind durch Pfeile angedeutet (siehe Text für die Zuordnung). B zeigt das Differenzspektrum von der mit Dithionit reduzierten und der oxidierten Probe.

Nach Reduktion des HoxFU-Moduls mit Dithionit waren Schultern bei 553, 605 und 665 nm (Abbildung 26B) zu beobachten, die Indizien sind für die neutral geladene Semichinon-Radikal-Form des FMNs oder für „Charge Transfer“-Komplexe (Johnson und Srivastava 1993). Beiträge von [Fe-S]-Clustern sind nicht komplett auszuschließen. Allerdings sollten sie aufgrund der niedrigen Extinktionskoeffizienten von reduzierten [2Fe-2S]- und [4Fe-4S]-Clustern eher gering sein. Die zusätzlichen Signale bei 370, 388 und 399 nm können auf die anionische Semichinonradikalform zurückgeführt werden (Massey und Palmer 1966; Abramovitz und Massey 1976; Nöll 2008). Bislang wurde die neutral geladene Semichinonform des Flavins weder für die native SH aus *R. eutropha* noch für das Hydrogenase-Modul aus *R. opacus* beobachtet (Schneider *et al.* 1984). Dies deutet darauf hin, dass dieser Redoxzustand nur im isolierten HoxFU-Protein bei niedrigen Potentialen ausgebildet werden kann. Unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten von  $12.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  für FMN bei 450 nm (der Wert repräsentiert den Durchschnitt der Extinktionskoeffizienten für gebundenes FMN in verschiedenen Proteinen, die zwischen  $10.500$  und  $15.400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  liegen) ergibt sich aus dem Differenz-Spektrum ein FMN-Gehalt von 0,9 FMN pro HoxFU-Molekül. Dies belegt auch, dass das FMN in HoxFU quantitativ durch Dithionit reduziert werden kann.

### 3.4.5 Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies

Es ist bekannt, dass Flavoenzyme wie Komplex I (Kussmaul und Hirst 2006) oder die native SH reaktive Sauerstoffspezies wie z. B. Superoxid produzieren. Studien an der nativen SH haben zuvor gezeigt, dass deren Produktion von Superoxid mit der gleichzeitigen Inaktivierung des Enzyms korreliert (Schneider und Schlegel 1981). Daher sollte untersucht werden, ob das Diaphorase-Modul ebenfalls Superoxid erzeugt.

Für die Quantifizierung der Superoxidproduktion durch HoxFU mit NADH und O<sub>2</sub> wurde ein etablierter Assay eingesetzt, der die superoxidabhängige Oxidation von Hydroxylamin zu Nitrit nutzt (Schneider und Schlegel 1981). Um die FMN-Freisetzung durch HoxFU aufgrund hoher NADH-Konzentrationen zu vermeiden, wurden die Messungen in Gegenwart von 25 µM NADH durchgeführt, was deutlich unterhalb des K<sub>M</sub>-Wertes liegt (Kapitel 3.4.3). Das HoxFU-Modul produzierte in Gegenwart von 300 µM O<sub>2</sub> 53,5 nmol mg<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup> Superoxid (Tabelle 11). Dies entspricht einer Umsatzrate von 5,9 min<sup>-1</sup> und ist etwa 10-fach höher als die entsprechende Umsatzrate der nativen SH (0,5 min<sup>-1</sup>) (Schneider und Schlegel 1981). Die HoxFU-vermittelte O<sub>2</sub>-Reduktions Aktivität war allerdings mehr als 6500-fach geringer als die BV-Reduktionsaktivität (349 µmol x min<sup>-1</sup> x mg<sup>-1</sup>). In O<sub>2</sub>-gesättigtem Puffer (1,4 mM O<sub>2</sub>) erhöhte sich die Superoxid-Produktion um das 8- bis 9-Fache. Die Zugabe von Superoxiddismutase führte zu einer starken Erniedrigung der Superoxid-Produktion und bestätigte somit die Spezifität des Tests (siehe Tabelle 11). Aufgrund der gemessenen Superoxid-Umsatzraten kann davon ausgegangen werden, dass HoxFU die Hauptquelle der Superoxid-Produktion des nativen Enzyms ist.

**Tabelle 11: NADH-vermittelte Produktion von Superoxid durch HoxFU in Gegenwart von O<sub>2</sub><sup>a</sup>**

O <sub>2</sub> -Konzentration im Reaktionsansatz [µM]	Superoxid Produktion	
	Spezifische Aktivität [nmol x mg <sup>-1</sup> x min <sup>-1</sup> ]	Umsatzrate [min <sup>-1</sup> ]
300 µM (luftgesättigt)	53,5 ± 7,4	5,9 ± 0,8
1428 µM (100 % O <sub>2</sub> )	465,0 ± 23,9	51,2 ± 2,6
1428 µM (100 % O <sub>2</sub> ) + 650 Units SOD <sup>b</sup>	13,0 ± 4,9	1,4 ± 0,5

<sup>a</sup>HoxFU (4,9 pmol) wurde mit 25 µM NADH in zwei verschiedenen O<sub>2</sub>-Konzentrationen bei 25°C inkubiert. Superoxid-Produktion wurde spektrophotometrisch auf der Basis der Hydroxylamin Oxidation gemessen. Eine Einheit (Unit) von Superoxiddismutase (SOD) ist definiert als die Menge, die von SOD erforderlich ist, um die Rate der Xanthinoxidase-vermittelten Reduktion von Cytochrom c um 50 % zu hemmen. Die Werte stellen das arithmetische Mittel und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten dar.

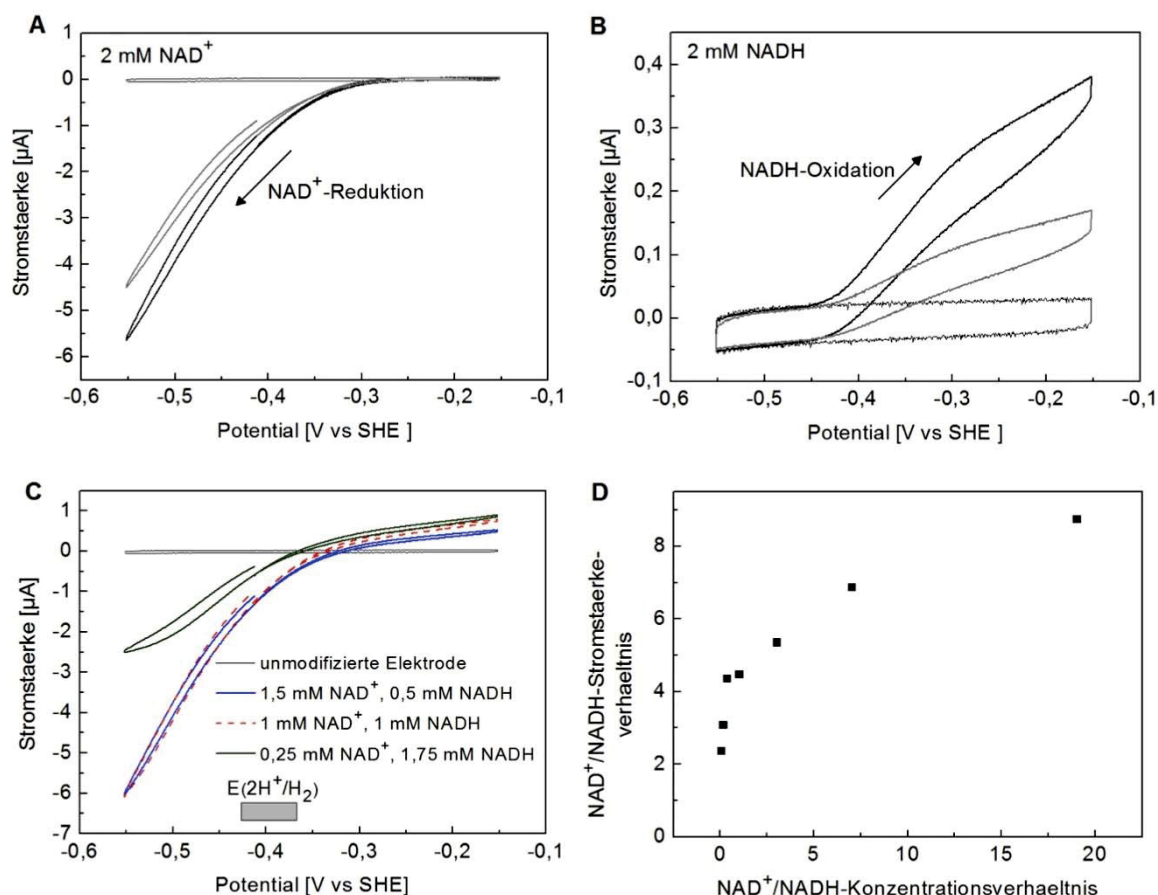
### 3.4.6 Elektrochemische Untersuchung des HoxFU-Moduls

Die katalytischen Eigenschaften des Diaphorase-Moduls wurden mittels Proteinfilm-Voltametrie in Zusammenarbeit mit Dr. Zul Idris und Dr. Kylie Vincent am Department of Chemistry/ Inorganic Chemistry Laboratory der Universität Oxford charakterisiert. Es sollten Fragen zur katalytischen Präferenz („Bias“), zur Inhibition durch die Endprodukte und zur Sauerstofftoleranz geklärt werden.

### 3.4.7 Katalytische Präferenz („Bias“) des Diaphorase-Moduls

Das Diaphorase-Modul kann sowohl die  $\text{NAD}^+$ -Reduktion als auch die  $\text{NADH}$ -Oxidation katalysieren (Abbildung 27). Die Elektrode wurde dabei mit 2500 rpm (Umdrehungen per Minute) gedreht, um die effiziente Versorgung des Proteins mit Substrat sowie die rasche Entfernung von Produkten von der Elektrodenoberfläche zu gewährleisten. Für die nicht mit Protein beladene Elektrode wurde in Gegenwart von  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADH}$  über dem experimentellen Potentialbereich von -600 bis +250 mV kein faradayscher Strom beobachtet (Abbildung 27). Demnach werden  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADH}$  unter den Versuchsbedingungen nicht direkt über die Elektrode reduziert bzw. oxidiert.

Die Untersuchung des auf der Elektrode immobilisierten HoxFU-Proteins wurde in Gegenwart verschiedener Mischungsverhältnisse von  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADH}$  vorgenommen. Die Gesamtkonzentration beider Pyridinnukleotid-Formen lag dabei bei 2 mM, was in etwa der physiologischen Konzentrationen von  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADH}$  im Cytoplasma von *E. coli* entspricht (Bennett *et al.* 2009). In Gegenwart von 2 mM  $\text{NAD}^+$  startete die HoxFU-vermittelte Reduktion von  $\text{NAD}^+$  bei etwa -280 mV und erreichte bei -550 mV ihr Maximum (Abbildung 22A). Die Oxidation von  $\text{NADH}$  (in Gegenwart von 2 mM  $\text{NADH}$ ), begann bei ca. -450 mV (Abbildung 27B) und stieg dann bis +300 mV kontinuierlich an. Der Rückgang der katalytischen Ströme zwischen dem jeweils ersten und zweiten Messzyklus (Abbildung 27A, B) liegt vermutlich an der langsamen Dissoziation des Proteinfilms von der Elektrode, könnte aber auch auf Protein-Denaturierung oder Verlust der Aktivität durch Freisetzung des FMN-Kofaktors zurückzuführen sein.



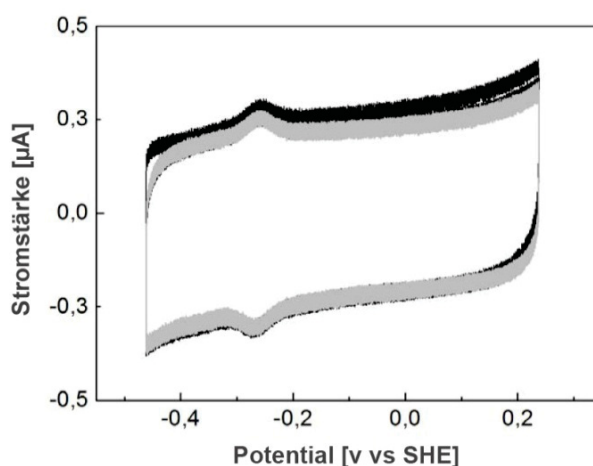
**Abb. 27: Katalytische Präferenz des HoxFU-Moduls.** Zyklische Voltammogramme (CV) für eine HoxFU-modifizierte Elektrode in Gegenwart verschiedener Verhältnisse von NAD<sup>+</sup> und NADH im Reaktionspuffer. **A:** 2 mM NAD<sup>+</sup> **B:** 2 mM NADH, **C:** Konzentrationen wie angegeben. In A und B ist der erste Zyklus schwarz und der zweite grau gekennzeichnet. Weitere Bedingungen: Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 8,0) 30 °C, "Scan"-Rate 10 mV/s, Elektrodenrotation: 2500 min<sup>-1</sup>, weitere Details im Text. In Teilabbildung C zeigt der graue Balken den Potentialbereich für E(2H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>) für H<sub>2</sub>-Konzentrationen zwischen 100 nM und 10 μM H<sub>2</sub> bei pH 8,0 und 30 °C. Die zyklischen Voltammogramme in A und C wurden bei -440 mV gestartet, in B bei -550 mV. Das Potential wurde zunächst in Richtung positiver Werte verändert. **D:** Die Stromstärke bei 140 mV ober- und oberhalb von E(NAD<sup>+</sup>/NADH) wurde ins Verhältnis zur Substratkonzentrationen gesetzt (Gesamtkonzentration für NAD<sup>+</sup> und NADH: 2 mM)

Abbildung 27C zeigt Voltammogramme, die mit verschiedenen NAD<sup>+</sup>-NADH-Mischungen aufgenommen wurden. In allen Fällen schneidet das Signal des katalytischen Stroms die Stromstärkeachse in der Nähe des thermodynamischen Potentials für E(NAD<sup>+</sup>/NADH) (grauer Balken, mit jeder Dekadenveränderung in der [NAD<sup>+</sup>/NADH]-Konzentration verschiebt sich das Potential um ~30 mV), was auf ein lediglich minimales Überpotential hindeutet. Die thermodynamisch effiziente Katalyse von NAD<sup>+</sup>-Reduktion und NADH-Oxidation im HoxFU-Modul optimiert die treibenden Kräfte für die Kopplung dieser Reaktionen mit der H<sub>2</sub>-Oxidation bzw. H<sup>+</sup>-Reduktion im Hydrogenase-Modul des nativen Enzyms. Jedes Voltammogramm in Abbildung 27C wurde mit einem neuen HoxFU-Proteinfilm aufgenommen. Variationen in der Proteinbeschichtung der Elektrode sorgen

dafür, dass die Stärke des Stroms kein verlässlicher Indikator für die absolute Aktivität bei der jeweiligen Substratkonzentration ist. Um die katalytische Präferenz („Bias“) des Enzyms bei unterschiedlichen  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -Konzentrationen zu bestimmen, wurde daher der relative Strom als Verhältnis aus  $\text{NAD}^+$ -Reduktion und  $\text{NADH}$ -Oxidation jeweils 140 mV oberhalb und unterhalb des Null-Strom-Potentials bestimmt. Bei allen untersuchten  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -Verhältnissen war die  $\text{NAD}^+$ -Reduktion höher als die  $\text{NADH}$ -Oxidation. Demnach liegt die katalytische Präferenz („Bias“) des HoxFU-Moduls der SH auf Seiten der  $\text{NADH}$ -Produktion.

### 3.4.8 Das HoxFU-Modul setzt in Abwesenheit von Substrat FMN frei

Zyklische Voltammogramme des HoxFU-Moduls, die in Abwesenheit von Substrat ( $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ) aufgenommen wurden, zeigten eine markante Erhöhung des Stroms bei etwa -280 mV. Die gleiche Beobachtung wurde für eine unbeladene Elektrode in Gegenwart von 2  $\mu\text{M}$  FMN gemacht, jedoch nicht für eine mit HoxFU beladene Elektrode in Anwesenheit von  $\text{NAD}^+$  und/oder  $\text{NADH}$  (Abbildung 28). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die Signale von freigesetztem FMN stammen, das das HoxFU-Modul infolge der Reduktion verlassen hat und auf der Elektrodenoberfläche adsorbierte. Dies steht in Einklang mit der Freisetzung von FMN durch das in Lösung befindliche HoxFU-Protein nach Reduktion mit  $\text{NADH}$  (Kapitel 3.4.3).

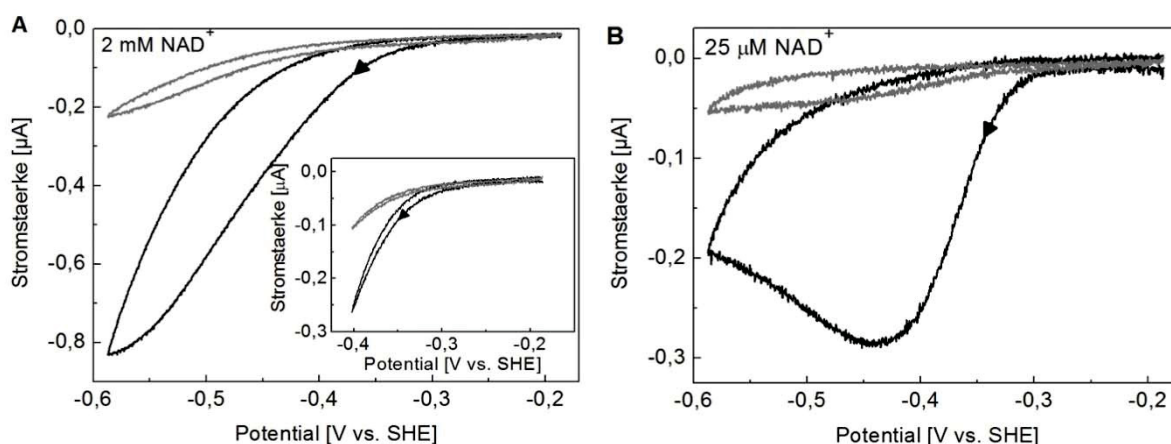


**Abb. 28:** Zyklische Voltammogramme für eine PGE-Elektrode mit 2  $\mu\text{M}$  FMN (schwarz) und *R. eutropha* HoxFU (grau). Beide wurden bei 100 mV/ s in einer Lösung von 50 mM Tris-HCl pH 8,0-Puffer aufgezeichnet.

### 3.4.9 Inaktivierung von HoxFU bei niedrigen Potentialen

Wurde das Potential während der zyklischen Voltammetrie nur langsam geändert (1 mV/s), so führte die  $\text{NAD}^+$ -Reduktion bei niedrigen Potentialen zu einem irreversiblen Verlust der Enzymaktivität (Abbildung 29).



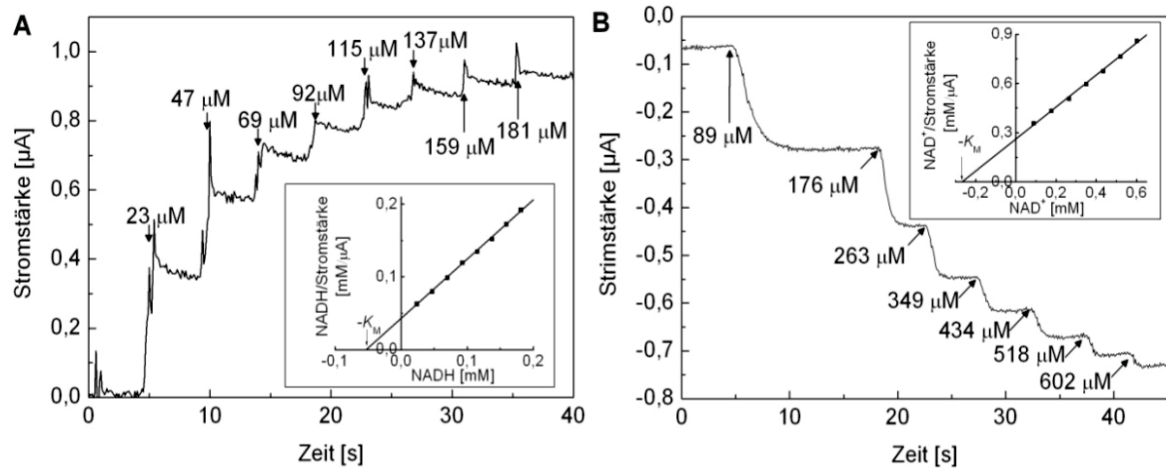


**Abb. 29: Irreversible Inaktivierung von HoxFU bei niedrigen Potentialen.** Die Scan-Rate betrug 1 mV/s, die Elektrodenrotation 2500 rpm in 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,0, 30 °C. Der erste Zyklus ist als dicke, schwarze Linie gezeigt, der zweite als dünne, graue Linie. Die Pfeile zeigen die Richtung der Potentialveränderung. Der Einschub in A zeigt ein zyklisches Voltammogramm, bei dem bereits bei -0,4 V wieder zu höherem Potential verändert wurde.

Dieser Effekt wird entweder durch Dissoziation des Proteins von der Elektrode oder durch Protein-Denaturierung hervorgerufen und ist bei geringen  $\text{NAD}^+$ -Konzentrationen besonders ausgeprägt (Abbildung 29B). Hier war eine deutliche Verminderung des Stroms, d.h. der HoxFU-Aktivität, bei Potentialen niedriger als -0,4 V zu beobachten. Dass diese Inaktivierung nur bei niedrigen Potentialen auftritt, zeigt das zyklische Voltammogramm, bei dem das Potential bereits bei -400 mV wieder in positive Richtung verändert wurde (Abbildung 29A, Einschub).

#### 3.4.10 Affinität des HoxFU-Moduls für $\text{NAD}(H)$

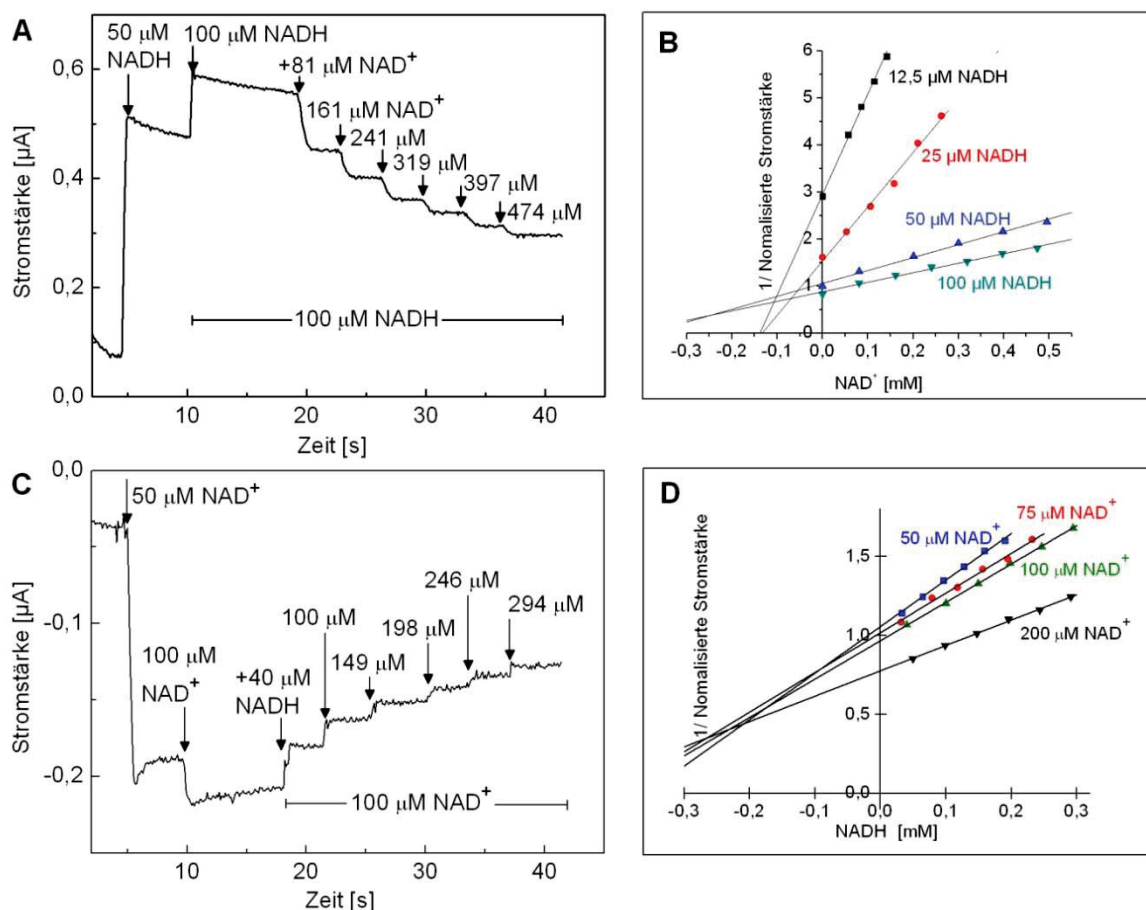
Mit Hilfe von elektrochemischen Experimenten wurden die  $K_M$ -Werte für NADH und  $\text{NAD}^+$  bestimmt. Für die  $K_M$ -Bestimmung für NADH wurde das Potential der mit HoxFU beschichteten Elektrode auf +262 mV eingestellt, die NADH-Konzentration im Reaktionsraum variiert und der resultierende Katalysestrom gemessen. Der aus den Messdaten erstellte Hanes/Woolf-Plot ergab einen  $K_M$ -Wert für NADH von  $58 \pm 18 \mu\text{M}$  (Abbildung 30A), der vergleichbar ist mit dem Wert von  $56 \mu\text{M}$ , der aus den mit BV durchgeführten Aktivitätsmessungen ermittelt wurde (Kapitel 3.4.3). Zur Bestimmung des  $K_M(\text{NAD}^+)$  wurde in einem analogen Experiment das Elektrodenpotential bei -412 mV gehalten und die Konzentration von  $\text{NAD}^+$  verändert. Aus diesem Experiment ergab sich ein  $K_M(\text{NAD}^+)$ -Wert von  $197 \pm 28 \mu\text{M}$  (Abbildung 30B).



**Abb. 30:  $K_M$ -Wert-Bestimmung für NAD(H) mittels Elektrochemie.** A: Die NADH-Oxidation wurde bei +262 mV und verschiedenen NADH-Konzentrationen verfolgt. B: Die NAD<sup>+</sup>-Reduktion wurde bei -412 mV und verschiedenen NAD<sup>+</sup>-Konzentrationen verfolgt. Weitere Bedingungen: Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 8,0), 30 °C, Elektrodendrehrate: 2500 rpm. Die Einschübe zeigen Hanes/Woolf-Auftragungen zur Bestimmung der  $K_M$ -Werte; Werte in (B) wurden korrigiert für einen nicht-faradayischen Strom, der bei Abwesenheit von Substrat auftrat.

### 3.4.11 Endproduktinhibition von HoxFU durch NAD(H)

Wird die Diaphorase-Aktivität von HoxFU durch die Endprodukte inhibiert? Dafür wurde das jeweilige Produkt (NAD<sup>+</sup> oder NADH) während der HoxFU-vermittelten NADH-Oxidation bzw. NAD<sup>+</sup>-Reduktion hinzugegeben. Die Ergebnisse in Abbildung 31A zeigen, dass die HoxFU-vermittelte NADH-Oxidation durch das Produkt NAD<sup>+</sup> gehemmt wird. Zuerst wurde NADH in einer Konzentration von 50 µM hinzugegeben und der resultierende Strom gemessen. Dies erfolgte, um die Ergebnisse, die mit verschiedenen Proteinfilmen erzielt wurden, später zu normalisieren. Durch eine weitere Injektion wurde die NADH-Konzentration auf 100 µM angehoben, um die Inhibition durch NAD<sup>+</sup> bei der Anwesenheit von 100 µM NADH zu verfolgen. Danach erfolgten Injektionen verschiedener Mengen einer NAD<sup>+</sup>-Stammlösung (100 mM NAD<sup>+</sup>, 100 µM NADH).

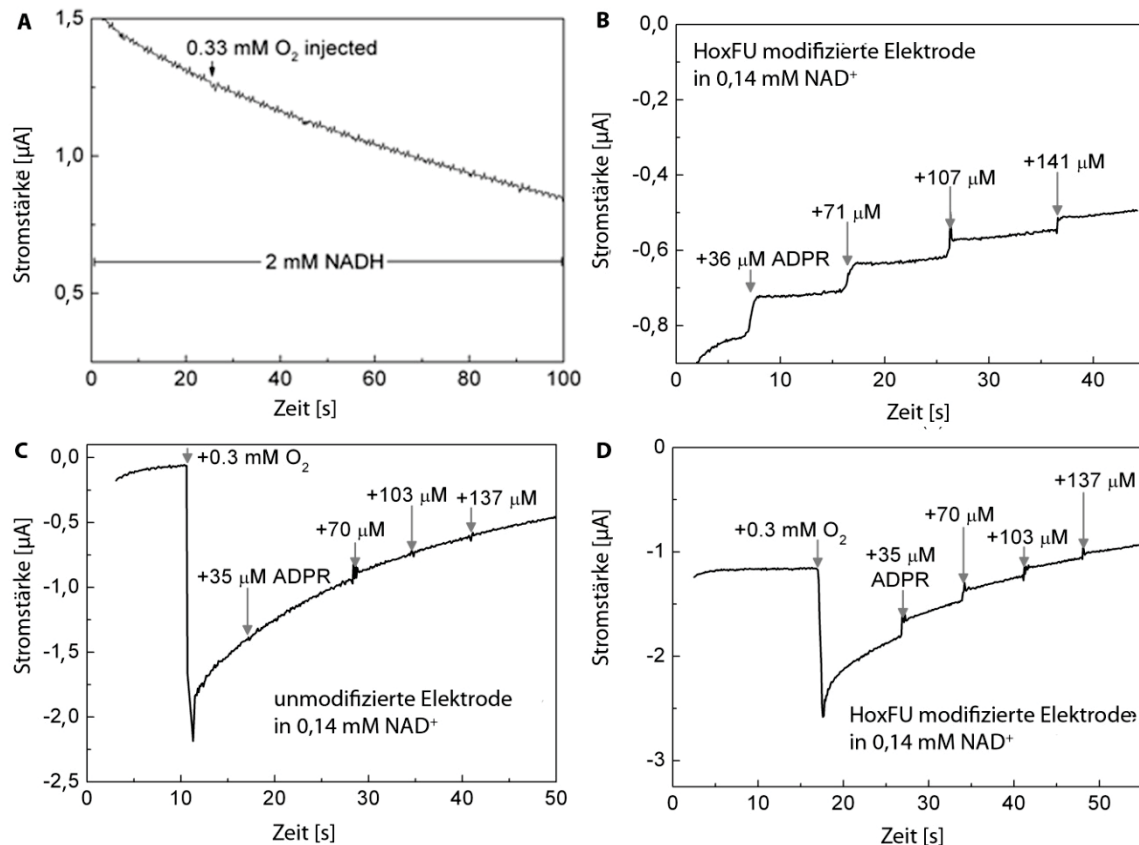


**Abb. 31: Produkthemmung des HoxFU-Moduls.** Die NADH-Oxidation wurde bei  $-62$  mV (A) und  $\text{NAD}^+$ -Reduktion bei  $-412$  mV (C) und  $50$   $\mu\text{M}$  und  $100$   $\mu\text{M}$  NAD(H) verfolgt. Verschiedene Konzentrationen von  $\text{NAD}^+$  und NADH wurden zu dem Reaktionsansatz hinzugegeben und die HoxFU-vermittelte Aktivität bestimmt (siehe Text für Details). Analoge Experimente für verschiedene Substratkonzentration von  $\text{NAD}^+$  und NADH wurden durchgeführt und Dixon-Plots für die  $K_I$  Bestimmung (Abbildungen B und D) erstellt. Die Experimente wurden bei  $30^\circ\text{C}$  mit einer rotierenden Elektrode (2500 Umdrehungen per Minute) durchgeführt.

Dies führte jeweils zu einem definierten Rückgang des Stroms. In dem Fall, dass das HoxFU-Protein keiner Produktinhibition unterliegt, sollte die Zugabe  $\text{NAD}^+$  bei einem konstanten Potential lediglich zu einem geringen Abfall des katalytischen Stroms führen, da sich die treibende Kraft für die NADH-Oxidation in Bezug auf E ( $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ) leicht erniedrigt. Die beobachteten Stromabfälle nach jedem Hinzufügen von  $\text{NAD}^+$  waren allerdings zu groß, um nur durch Änderung in der treibenden Kraft erklärt werden zu können. Daraus folgend wurde die Inhibitionskonstante für  $\text{NAD}^+$  ( $K_I(\text{NAD}^+)$ ) bestimmt, indem das Experiment mit verschiedenen NADH- $\text{NAD}^+$ -Verhältnissen wiederholt wurde. Die resultierenden Ströme wurden durch den Strom bei  $50$   $\mu\text{M}$  NADH dividiert und dadurch normalisiert. Die Auswertung über einen „Dixon Plot“ ergab einen  $K_I$  für  $\text{NAD}^+$  von ca.  $0,1$ - $0,3$  mM (Abbildung 31B). Analoge Experimente zur Inhibition der  $\text{NAD}^+$ -Reduktion ergaben einen  $K_I(\text{NADH})$  von ca.  $0,2$ - $0,3$  mM (Abbildung 31CD).

### 3.4.12 Die Sauerstofftoleranz des Diaphorase-Moduls

Um die Sauerstofftoleranz des HoxFU-Moduls zu untersuchen, wurde zuerst die NADH-Reduktionsrichtung betrachtet (Abbildung 32A). Um die direkte Reduktion von  $O_2$  an der Graphit-Elektrode zu vermeiden, wurde die NADH-Reduktion bei einem Potential von +243 mV verfolgt. In Gegenwart von 2 mM NADH wurde ein langsamer Verlust des Stromes beobachtet, der durch Instabilität des Enzymfilms erklärbar ist.



**Abb. 32: Sauerstofftoleranz des HoxFU-Moduls.** A: Die Sauerstofftoleranz der NADH-Oxidation wurde bei einem Potential von +243 mV getestet. Nach 25 s wurde Sauerstoff gesättigter Puffer hinzugegeben und die Enzymaktivität verfolgt. B-D: Tests zur Sauerstofftoleranz der  $NAD^+$ -Reduktion. B: Inhibition der  $NAD^+$ -Reduktion durch Injektionen von ADP-Ribose in Abwesenheit von Sauerstoff und bei -412 mV. C zeigt  $O_2$ -Reduktion durch eine unmodifizierte Elektrode in Gegenwart von ADP-Ribose (bei -412 mV) und bestätigt, dass Injektionen von ADP-Ribose keinen Einfluss auf die  $O_2$ -Reduktion haben. D zeigt ein analoges Experiment mit einem Proteinfilm von HoxFU. Bei den Experimenten wurde 0,14 mM  $NAD^+$  und 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0 verwendet.

Nach 25 s wurde  $O_2$ -gesättigter Puffer mit 2 mM NADH in die Zelle injiziert und so die  $O_2$ -Konzentration auf ca. 0,33 mM eingestellt. Es wurde keine Erniedrigung des katalytischen Stroms festgestellt, was darauf hinweist, dass die von HoxFU katalysierte NADH-Oxidation nicht durch  $O_2$  gehemmt wird. Anschließend wurde die Empfindlichkeit der  $NAD^+$ -Reduktionsaktivität gegenüber  $O_2$  getestet, wobei eine von Armstrong und Mitarbeitern etablierte Methode verwendet wurde. Dabei wird ein Inhibitor eingesetzt, um die Enzymaktivität von der Sauerstoffreduktion zu unterscheiden, die bei einer unmodifizierten Graphitelektrode bei einem Potential von -412 mV bereits erheblich ist. Nur die

Enzymaktivität wird durch den Inhibitor gehemmt, die Sauerstoffreduktion auf der Graphitelektrode bleibt jedoch unverändert. (Goldet *et al.* 2008). Die Abbildung 32B zeigt, dass ADP-Ribose ein Inhibitor der  $\text{NAD}^+$ -Reduktion durch HoxFU ist. Auf die  $\text{O}_2$ -Reduktion einer unmodifizierten Elektrode hat ADP-Ribose keinen Einfluss, siehe Abbildung 32C. Bei einem analogen Experiment mit einem Proteinfilm von HoxFU in Gegenwart von Sauerstoff führten Injektionen von ADP-Ribose nun zu einem Abfall der Stromstärke. Dies bestätigt, dass HoxFU in Gegenwart von  $\text{O}_2$  aktiv ist, also durch ADP-Ribose gehemmt werden kann und mit einem elektrokatalytischen  $\text{NAD}^+$ -Reduktionsstrom zu dem Gesamtstrom beiträgt.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass das HoxFU-Modul in Gegenwart von  $\text{O}_2$  sowohl die NADH-Oxidation als auch die  $\text{NAD}^+$ -Reduktion katalysiert. Beide Katalyserichtungen unterliegen der Produktinhibition durch  $\text{NAD}^+$  bzw. NADH.

### 3.5 Untersuchungen zur Sauerstofftoleranz der SH

In dem Kapitel 3.3.9 wurde gezeigt, dass das [NiFe]-Zentrum der SH reversibel durch  $\text{O}_2$  inaktiviert wird. Oxidiertes SH-Enzym kann durch Zugabe von NADH reaktiviert werden (Schneider *et al.* 1976). Die Inkubation von katalytisch aktivem HoxHY-Protein mit  $\text{O}_2$  führte zu einer langsamen Inaktivierung. Durch Anlegen eines niedrigen Potentials konnte die Aktivität jedoch in Sekundenschnelle wiederhergestellt werden (Kapitel 3.3.9). Des Weiteren ist bekannt, dass die SH neben Wasserstoff auch Sauerstoff reduzieren kann (Schneider und Schlegel 1976). Von Cracknell und Mitarbeitern wurde die Hypothese aufgestellt, dass sauerstofftolerante Hydrogenasen im Rahmen der  $\text{H}_2$ -Oxidation einen Teil der Elektronen für die Reduktion von  $\text{O}_2$  verwenden und bei diesem Prozess kontinuierlich Wasser produziert wird (Cracknell *et al.* 2009). Bislang konnte diese Hypothese noch nicht experimentell überprüft werden. Die SH bietet hierfür ein hervorragendes Testsystem, da die SH 100% aktiv in ihrer  $\text{H}_2$ -abhängigen  $\text{NAD}^+$ -Reduktionsaktivität in Gegenwart von atmosphärischen Sauerstoffkonzentrationen bleibt (Schneider 1981). Außerdem repräsentiert die SH ungefähr 5 % der cytoplasmatischen Proteine in *R. eutropha* und kann in großen Mengen gereinigt werden (Kapitel 3.2).

#### 3.5.1 Eingesetzte Derivate für die Experimente zur Sauerstofftoleranz der SH

Um die Produkte der reduktiven Reaktivierung des oxidierten aktiven Zentrums zu identifizieren, wurde ~~zum einen~~ die gereinigte, native heterohexamere SH eingesetzt. Für die Fragestellung, ob die  $\text{H}_2$ -Oxidation für die  $\text{O}_2$ -Reduktion notwendig ist, wurde das  $\text{SH}^{\text{I64A}}$ -Derivat verwendet, das einen Austausch von Isoleucin zu Alanin an Position 64 der HoxH-Untereinheit besitzt.  $\text{SH}^{\text{I64A}}$  zeigte nur Spuren von  $\text{H}_2$ -Oxidation- und H/D-Austausch-Aktivität, jedoch weist es ein komplett assembliertes [NiFe]-Zentrum auf (Burgdorf *et al.*

2002; Burgdorf *et al.* 2005). Für die Produktion von SH<sup>I64A</sup> wurde ein Plasmid verwendet, welches die Gene *hoxFUYWihypA2B2F2CDEXA* unter dem nativen SH-Promoter trägt. Das *hoxH*-Gen trägt eine Mutation, die zur Synthese von HoxH<sup>I64A</sup> führt. Zudem codiert das Plasmid eine mit einem N-terminalen *Strep-tag*-II versehene HoxF-Untereinheit. Die Kultivierung des trankonjuganten Stammes und die Reinigung des SH<sup>I64A</sup>-Proteins erfolgte analog zum nativen Enzym. Aus 10 g Zellen (Nassgewicht) wurden ungefähr 60 mg SH<sup>I64A</sup> gereinigt mit einer spezifischen H<sub>2</sub>-Oxidationsaktivität von lediglich  $0,38 \pm 0,01$  U/mg Protein, wobei NAD<sup>+</sup> als Elektronenakzeptor diente. Die NADH:Benzyliologen (BV)-Oxidoreduktase-Aktivität lag dagegen mit  $91,9 \pm 4,4$  U/mg auf dem Niveau des Wildtypenzyms ( $104,2 \pm 6,2$  U/mg). Die deutet darauf hin, dass der Aminosäureaustausch im SH<sup>I64A</sup>-Derivat zwar die H<sub>2</sub>-Oxidation nahezu zum Erliegen bringt, das HoxFU-Diaphorase-Modul jedoch funktionell ist. Als weiteres SH-Derivat zur Analyse der O<sub>2</sub>-Toleranz kam das isolierte HoxFU-Diaphorase-Modul zum Einsatz, dessen Eigenschaften in Kapitel 3.4 beschrieben sind.

### 3.5.2 Reduktionsmittel und FMN erhöhen die SH-Aktivität

Um eine möglichst hohe und stabile SH-Aktivität zu erreichen, wurden verschiedene redoxaktive Zusätze im Reaktionsansatz für die SH-Aktivitätsmessungen getestet. Wie schon zuvor in der Literatur beschrieben wurde (Schneider und Schlegel 1978), führte die Zugabe von FMN zur einer Erhöhung der wasserstoffabhängigen NAD<sup>+</sup>-Reduktionsaktivität um den Faktor zwei (Tabelle 12). Außerdem wurde festgestellt, dass die Reduktionsmittel DTT oder TCEP-HCl die Aktivität der gereinigten SH ebenfalls um den Faktor zwei erhöhten (Tabelle 12).

**Tabelle 12: Positiver Effekt von FMN und DTT/TCEP auf die wasserstoffabhängige NAD<sup>+</sup>-Reduktion (U/ mg) der SH.** Die Konzentration von FMN, DTT und TCEP betrug 1 µM, 1 mM bzw. 1 mM. Die Reaktion wurde mit 2-5 µg SH gestartet.

Ohne Zusatz	FMN	TCEP <sup>a</sup>	DTT <sup>a</sup>	FMN/ TCEP	FMN/ DTT
50,4 ± 6,6	105,3 ± 6,0	107,8 ± 0,6	93,3 ± 4,1	111,0 ± 4,4	131,6 ± 14,7

<sup>a</sup> Ohne H<sub>2</sub> findet durch die Reduktionsmittel TCEP oder DTT keine SH-vermittelte NAD<sup>+</sup>-Reduktion statt. Die Werte repräsentieren das arithmetische Mittel sowie Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Außerdem war die lineare Phase der Enzymreaktion verlängert, so dass NAD<sup>+</sup> vollständig zu NADH reduziert werden konnte. Ohne TCEP oder DTT betrug die lineare Phase 30- 90 s und nur ungefähr 50% der eingesetzten NAD<sup>+</sup>-Moleküle wurden zu NADH umgesetzt. Allerdings ergab der kombinierte Einsatz von FMN und Reduktionsmitteln keinen additiven Effekt, was auf den gleichen Wirkungsort hindeutet. Die stimulierende Wirkung von FMN und DTT war nur im Falle der gereinigten SH zu beobachten; die SH-Aktivität in permeabilisierten Zellen



und löslichen Extrakten wurde nicht beeinflusst. Sofern nicht anderweitig beschrieben, wurde in den nachfolgenden Experimenten TCEP-HCl (1 mM), das gegenüber Luftoxidation unempfindlich ist, in Kombination mit FMN (1  $\mu$ M) eingesetzt.

### 3.5.3 Sauerstofftoleranz der nativen SH

Hydrogenase-Aktivitätsmessungen werden meist mit artifiziellen Elektronenakzeptoren wie Methylenblau oder Methylviologen durchgeführt, deren reduzierte Formen leicht durch  $O_2$  reoxidiert werden können. Untersuchungen zur Sauerstofftoleranz der nativen SH mit  $NAD^+$  als Elektronenakzeptor haben den Vorteil, dass NADH nicht durch Sauerstoff reoxidiert wird und dadurch Experimente in Gegenwart von Sauerstoff leicht durchgeführt werden können. Um den Einfluss von Sauerstoff auf die SH während der Katalyse zu testen, wurde die wasserstoffabhängige  $NAD^+$ -Reduktionsaktivität in der Gegenwart von verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen gemessen.

**Tabelle 13: SH-Aktivität in der Anwesenheit von Sauerstoff.** Für jeden Ansatz wurden verschiedene Anteile von mit Sauerstoff gesättigtem Puffer eingesetzt und diese mit Wasserstoff gesättigtem Puffer aufgefüllt. Die Gasphase enthielt entsprechende Gasmixturen.

$O_2$ [% v/v]	$O_2$ [mM]	SH-Aktivität [%]
0	0	100
20	0,23	98,4
40	0,47	84,5
60	0,70	81,5
80	0,93	79,0

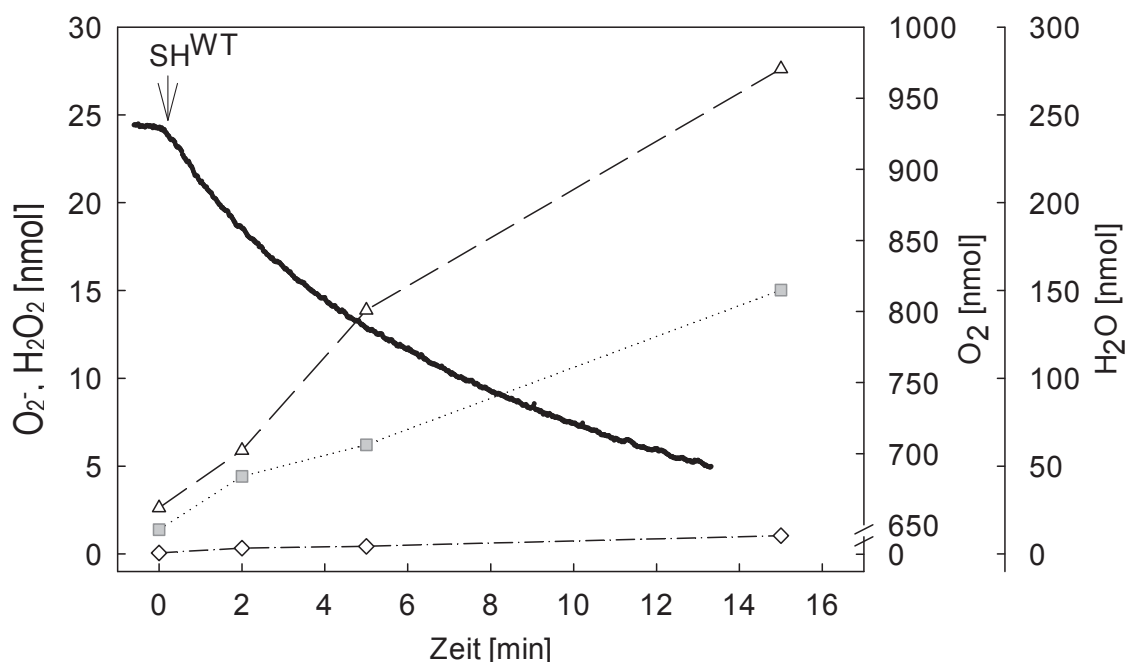
Die wasserstoffabhängige  $NAD^+$ -Reduktionsaktivität in Abwesenheit von  $O_2$  wurde als 100 % gesetzt. Die maximalen Raten wurden nach einer 0,5-1,5 minütigen lag-Phase erreicht und blieben für 1-2 min konstant.

Nach dem Equilibrieren des Reaktionsansatzes auf eine  $O_2$ -Konzentration von 20 % (v/v) wurde keine signifikante Inhibition der  $H_2$ -Oxidation detektiert. Die  $H_2$ -Umsatzrate blieb in Abwesenheit und Gegenwart von 20%  $O_2$  konstant bei  $480\text{ s}^{-1}$ . Eine Erhöhung der Sauerstoffkonzentration auf 40, 60 bzw. 80 % führte zu einer Erniedrigung der Wasserstoffoxiationsaktivität um lediglich 15, 19 und 21% (Tabelle 13), was im Einklang mit Literaturdaten steht (Schneider und Schlegel 1981). Bei  $O_2$ -Konzentrationen von 40 % und größer verlängerte sich die lag-Phase von ca. 0,5 min auf 1,5 min.

### 3.5.4 Der Sauerstoffreduktions-Aktivität der SH

Die  $O_2$ -Reduktionsaktivität der SH wurde mit einer Clark-Elektrode quantifiziert. Im Gegensatz zu den langen linearen  $H_2$ -abhängigen  $NAD^+$ -Reduktionsaktivitäten, sank die  $O_2$ -Reduktionsrate nach einigen Minuten. Um die kontinuierlich gemessenen  $O_2$ -Reduktionsraten mit den Punktmessungen der reduzierten Sauerstoffspezies zu vergleichen, wurde dieselbe

Zeitspanne für die Ratenbestimmungen gewählt (Abbildung 33). In Gegenwart von 40 %  $O_2$  zeigte das  $SH^{WT}$ -Protein eine  $H_2$ -abhängige  $O_2$ -Reduktionsaktivität von  $109 \pm 18,8 \text{ min}^{-1}$  (Tabelle 14). Das Verhältnis zwischen den Umsatzraten der wasserstoffabhängigen  $NAD^+$ -Reduktion ( $22755 \text{ min}^{-1}$ ) und Sauerstoffreduktion ( $109 \text{ min}^{-1}$ ) lag bei 209:1, d. h., dass ein Teil der Elektronen, die aus der  $H_2$ -Oxidation gewonnen werden, für die Reduktion von Sauerstoff verwendet werden.



**Abb. 33: Vergleich der Superoxid-, Wasserstoffperoxid- und Wasser-Produktionsaktivität mit der  $O_2$ -Reduktionsaktivität während der NADH-Oxidation** (in Anwesenheit von FMN). Rauten stellen Superoxid-, Dreiecke Wasser- und Quadrate Wasserstoffperoxid-Stoffmengen dar. Die Sauerstoff-Stoffmenge wurde kontinuierlich gemessen und ist als schwarze Linie gezeigt. Die produzierte Stoffmenge der reduzierten Sauerstoffspezies wurde normiert auf die eingesetzte SH-Proteinmenge, die für die  $O_2$ -Reduktionsmessung ( $m = 39 \mu\text{g } SH^{WT}$ ) eingesetzt wurde. Die NADH-abhängige  $O_2$ -Reduktionsaktivität zeigte eine kontinuierliche, zeitliche Abnahme.

Mit NADH als Elektronendonator zeigten die SH-Varianten  $SH^{WT}$ ,  $SH^{I64A}$  und  $SH^{FU}$  Sauerstoffreduktionsaktivitäten von  $94 \pm 17$ ,  $130 \pm 5$  und  $31 \pm 2 \text{ min}^{-1}$ . Im Gegensatz dazu betrug die NADH-abhängige  $H_2$ -Produktionsrate nur  $6,8 \text{ min}^{-1}$  und lag somit in der Größenordnung früherer Studien (Schneider und Schlegel 1976). Die  $H_2$ -Produktionsrate ist also um den Faktor 3300 geringer als die  $H_2$ -Oxidationsrate der SH.

### 3.5.5 Superoxid-Produktion durch die SH

Um zu ermitteln, welche Produkte im Rahmen der  $O_2$ -Reduktion der SH entstehen, wurde zunächst die Produktion von Superoxid überprüft. In den nachfolgenden Experimenten wurde eine initiale Sauerstoffkonzentration von 40 % verwendet. Die Bildung von Superoxid wurde in einem etablierten Reaktionsansatz verfolgt, der die superoxidabhängige Oxidation von Hydroxylamin ausnutzt und bei der das gebildete Nitrit colorimetrisch bestimmt wird

(Schneider und Schlegel 1981). Im Falle der Verwendung von  $\text{H}_2$  als Elektronendonator und  $\text{NAD}^+$  sowie  $\text{O}_2$  als Elektronenakzeptoren wurde für das  $\text{SH}^{\text{WT}}$ -Protein eine Superoxidproduktionsrate von  $1,1 \text{ min}^{-1}$  ermittelt (Tabelle 14). Diese liegt in der gleichen Größenordnung wie der Literaturwert von  $0,5 \text{ min}^{-1}$  (Schneider und Schlegel 1981).

**Tabelle 14. Netto  $\text{O}_2$ -Reduktionsraten im Vergleich zu den individuellen Produktionsraten für Superoxid, Wasserstoffperoxid und Wasser für SH-Varianten unter verschiedenen Reaktionsbedingungen.**

Protein	$\text{O}_2$ - Reduktionsrate ( $\text{min}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$\text{O}_2^-$ - Produktionsrate ( $\text{min}^{-1}$ )	$\text{H}_2\text{O}_2$ - Produktionsrate ( $\text{min}^{-1}$ )	$\text{H}_2^{18}\text{O}$ - Produktionsrate ( $\text{min}^{-1}$ )	detektierte Sauerstoffatome [%] <sup>b</sup>
$\text{H}_2 \rightarrow \text{NAD}^+ / (^{18})\text{O}_2$					
$\text{SH}^{\text{WT}}$	$109 \pm 19$	$1,1 \pm 0,1$	$55 \pm 7$	$122 \pm 8$	107
$\text{SH}^{\text{I64A}}$	$< 10$	$0,25 \pm 0,02$	$< 0,04$	$< 0,1$	-
$\text{NADH} \rightarrow \text{H}^+ / (^{18})\text{O}_2$					
$\text{SH}^{\text{WT}}$	$94 \pm 17$	$0,45 \pm 0,11$	$5,8 \pm 0,6$	$116 \pm 9$	68
$\text{SH}^{\text{I64A}}$	$130 \pm 5$	$0,31 \pm 0,04$	$16 \pm 5$	$124 \pm 22$	82
$\text{SH}^{\text{FU}}$	$31 \pm 2$	$0,46 \pm 0,04$	$0,2 \pm 0,1$	$67 \pm 10$	110

<sup>a</sup> Reduktions-/Produktionsraten wurden in Anwesenheit von 40 %  $\text{O}_2$  gemessen, wie in Material und Methoden beschrieben. Die Werte entsprechen arithmetischen Mitteln und entsprechende. Keine  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  Produktion wird mit  $^{16}\text{O}_2$  anstatt mit  $^{18}\text{O}_2$  detektiert. Ebenso wurde keine  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  Produktion in der Abwesenheit von NADH gemessen. <sup>b</sup> Angegeben ist der Anteil der in den Produkten gefundenen Sauerstoffatome (wurde aus den Mittelwerten bestimmt) im Verhältnis zur Gesamtheit der reduzierten Sauerstoffatome.

Das  $\text{SH}^{\text{I64A}}$ -Protein zeigte mit  $0,25 \pm 0,02$  eine vierfach geringere Rate als das Wildtyp-Protein. Für die reverse Reaktion, d. h. die NADH-abhängige  $\text{O}_2$ -Reduktion, wurden für die SH-Varianten  $\text{SH}^{\text{WT}}$ ,  $\text{SH}^{\text{FU}}$  und  $\text{SH}^{\text{I64A}}$  Superoxid Produktionsraten von 0,31, 0,46 und  $0,45 \text{ min}^{-1}$  gemessen (siehe Tabelle 14). Bemerkenswerterweise waren diese Werte etwa 30-mal niedriger als die in Kapitel 3.4.5 beschriebene Superoxid-Produktionsrate des  $\text{SH}^{\text{FU}}$ -Moduls. Während bei den in Kapitel 3.4.5 beschriebenen Superoxidproduktionsmessungen nur  $25 \mu\text{M}$  NADH eingesetzt wurden, wurden hier  $1000 \mu\text{M}$  eingesetzt. Diese Konzentration ist weit höher als der  $K_{\text{M}}$ -Wert des Diaphorase-Moduls ( $56 \mu\text{M}$  NADH). Das bedeutet, dass im Fall der höheren NADH-Konzentration die NADH-Bindestelle häufiger durch das Substrat NADH okkupiert ist und so Sauerstoff seltener durch Elektronen des reduzierten FMN reduziert werden kann. Dies könnte die verminderte Superoxidproduktionsrate erklären. .

### 3.5.6 Produktion von Wasserstoffperoxid durch die SH

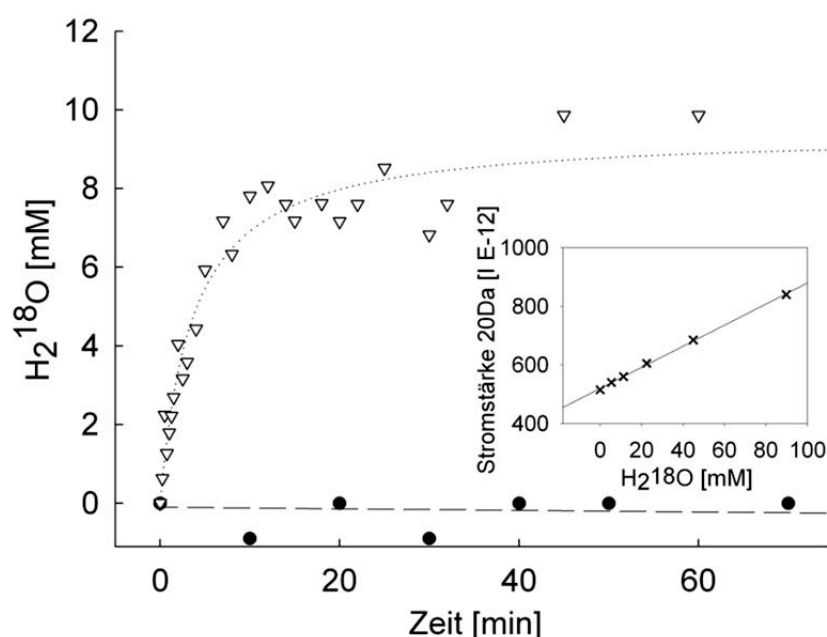
Die Superoxid-Produktionsrate des  $\text{SH}^{\text{WT}}$ -Enzyms ist um zwei Größenordnungen kleiner als die  $\text{O}_2$ -Reduktions-Aktivität. Dies impliziert, dass andere reduzierte Sauerstoffspezies als Hauptprodukte im Rahmen der  $\text{O}_2$ -Reduktion freigesetzt werden. Deshalb wurde die Fähigkeit der SH untersucht, Wasserstoffperoxid zu produzieren, das durch die Zwei-Elektronen-Reduktion von Sauerstoff erzeugt wird. Die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion wurde durch die

Meerrettich-Peroxidase-vermittelte Oxidation von Amplex<sup>TM</sup> Red quantifiziert. Die H<sub>2</sub>-abhängige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion des SH<sup>WT</sup>-Enzyms in Gegenwart von NAD<sup>+</sup> und O<sub>2</sub> betrug 267 mU/ mg. Dieser Wert entspricht einer Umsatzrate von 55 min<sup>-1</sup>, die etwa 50-mal höher als die entsprechende Superoxidproduktionsrate ist (Tabelle 14). Es ist wichtig zu erwähnen, dass Superoxid schnell mit einem weiteren Superoxidmolekül reagiert und zu Wasserstoffperoxid zerfällt, so dass die Wasserstoffperoxidsmessungen durch das Amplex Red<sup>TM</sup>-System die Superoxidproduktion beinhalten (Kussmaul und Hirst 2006). Wie erwartet zeigte die SH<sup>I64A</sup>-Variante im Falle der H<sub>2</sub>-Oxidation keine Wasserstoffperoxidproduktion in nachweisbaren Mengen, was im Einklang mit der sehr niedrigen Hydrogenaseaktivität des Enzyms (Kapitel 3.5.1) steht.

Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktionsraten aller drei SH-Varianten wurden auch in der NADH-Oxidationsrichtung gemessen (Tabelle 14). Für die SH<sup>WT</sup>- und SH<sup>I64A</sup>-Varianten wurden Raten von 6 und 16 min<sup>-1</sup> bestimmt, was zeigt, dass Wasserstoffperoxid auch durch reversen Elektronenfluss erzeugt wird. Interessanterweise besaß die SH<sup>FU</sup>-Variante nur eine sehr geringe H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktionsrate von 0,2 min<sup>-1</sup>. Sie ist 29-fach geringer als die des Wildtypenzyms und liegt damit in der Größenordnung der Superoxidproduktionsrate. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Wasserstoffperoxidproduktion auf den spontanen Zerfall des im SH<sup>FU</sup>-Modul produzierten Superoxids zurückzuführen ist. Dies deutet umgekehrt darauf hin, dass das Hydrogenase-Modul die Hauptquelle der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion ist.

### 3.5.7 Wasserproduktion durch die SH

Unter den reduzierten Sauerstoffspezies ist Wasser eindeutig das am wenigsten schädliche Produkt. Um zu testen, ob Wasser ein Produkt der O<sub>2</sub>-Reduktion der SH ist, wurde eine zuverlässige Detektion und Quantifizierung von H<sub>2</sub><sup>18</sup>O als Produkt der Reduktion von <sup>18</sup>O<sub>2</sub> durch die SH etabliert. Hierfür wurde ein Reaktionsansatz mit einem Volumen von 30-100 µl in ein gasdichtes Reaktionsgefäß (5,2 ml) verbracht. Der Ansatz enthielt 50-1000 µg SH und 1 mM NAD<sup>+</sup>; die verbliebene Gasphase wurde mit 40 % (v/v) <sup>18</sup>O<sub>2</sub> und 60 % (v/v) H<sub>2</sub> gefüllt. Bei Verwendung von NADH als Elektronendonator wurde die gleiche Enzymmenge mit 100 mM NADH unter einer Gasatmosphäre von 40 % <sup>18</sup>O<sub>2</sub> und 60 % N<sub>2</sub> inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils 10 µl des Reaktionsansatzes entnommen und die Reaktionsprodukte - wie in "Material und Methoden" - beschrieben massenspektrometrisch erfasst. Mit reinem H<sub>2</sub><sup>18</sup>O als Standard ermöglicht diese Methode die zuverlässige Erkennung von Konzentrationsänderungen von 1,8 mM H<sub>2</sub><sup>18</sup>O (siehe Abbildung 34) in Gegenwart von 111 mM H<sub>2</sub><sup>18</sup>O, die durchschnittlich in natürlichem Wasser vorhanden sind (Coplen 2002).



**Abb. 34:**  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  Produktion der SH im Laufe der  $\text{H}_2$ -Oxidation in Gegenwart von  $^{18}\text{O}_2$ . Eine Proteinmenge von 90  $\mu\text{g}$   $\text{SH}^{\text{WT}}$  (Dreiecke) und  $\text{SH}^{\text{I64A}}$  (Kreise) wurde in einem 100  $\mu\text{l}$  Reaktionsansatz in einem geschlossenen Gefäß mit  $\text{H}_2$  und  $^{18}\text{O}_2$  inkubiert. Die  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ -Konzentration in der Reaktionsmischung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten durch Massenspektrometrie bestimmt (siehe Materialien und Methoden). Der Einschub zeigt die Kalibrierungsgerade mit  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  ( $R^2 = 0,9991$ ).

Im Falle der  $\text{H}_2$ -Oxidation in Gegenwart von  $\text{NAD}^+$  und  $^{18}\text{O}_2$  zeigte das  $\text{SH}^{\text{WT}}$ -Enzym mit  $0,60 \pm 0,04$  U pro mg Protein eine beträchtliche  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ -Produktion (Abbildung 34). Dieser Wert entspricht einer Umsatzrate von  $122 \text{ min}^{-1}$  (Tabelle 13). Die Zuverlässigkeit und Empfindlichkeit der Nachweismethode von  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  wurde durch den Einsatz der  $\text{SH}^{\text{I64A}}$ -Variante bestätigt, die in der  $\text{H}_2$ -Oxidation beeinträchtigt ist und  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  in nicht nachweisbaren Mengen produzierte (Abbildung 34). Dabei war die  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ -Produktionsrate der Wildtyp-SH etwa 2,2-fach bzw. 110-fach höher als die entsprechenden Produktionsraten für  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Superoxid.

**Tabelle 15:** Netto  $\text{O}_2$ -Umsatzrate der Xanthin-Oxidase verglichen mit den jeweiligen Produktionsraten für Superoxid, Wasserstoffperoxid und Wasser.<sup>a</sup>

Netto- $\text{O}_2$ - Reduktionsrate (mU/mg)	$\text{O}_2^-$ - Produktionsrate (mU/mg)	$\text{H}_2\text{O}_2$ - Produktionsrate (mU/mg)	$\text{H}_2^{18}\text{O}$ - Produktionsrate (mU/mg)
$504 \pm 62$	$23 \pm 4$	$265 \pm 10$	$85 \pm 4$

<sup>a</sup>  $\text{O}_2$ -Reduktion, Superoxidproduktion, Wasserstoffperoxid-Produktion und Wasser-Produktionsaktivitäten der Xanthinoxidase (aus Kuhmilch, Sigma) wurden wie in den Methoden zur SH beschrieben gemessen. Die Superoxid- und Wasserstoffperoxidmessungen wurden mit 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Xanthinoxidase und 3,3 mM Xanthin durchgeführt. Im Falle der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktionsmessungen wurde die Reaktion durch Ultrafiltration mit einem Microcon-Konzentrator (Ausschlussgröße 3 kDa, Merck Millipore, Deutschland) bei 4°C gestoppt. Der Durchfluss wurde anschließend hinsichtlich der Anwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  analysiert. Für die Wasserproduktionsmessungen wurden 732  $\mu\text{g}$  Xanthin-Oxidase und 12,5 mM Xanthin (gesättigte Suspension) in 100  $\mu\text{l}$  eingesetzt.

In einem weiteren Versuch wurde die NADH-vermittelte  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ -Produktion der SH-Varianten in Gegenwart von  $^{18}\text{O}_2$  getestet. Für die  $\text{SH}^{\text{WT}}$ - und  $\text{SH}^{\text{I64A}}$ -Proteine wurden dabei mit  $116 \text{ min}^{-1}$  und  $124 \text{ min}^{-1}$  vergleichbare Umsatzraten ermittelt (Tabelle 14). Diese Raten sind der des  $\text{SH}^{\text{WT}}$ -Enzyms sehr ähnlich, die im Rahmen der  $\text{H}_2$ -Oxidation in Gegenwart von  $\text{NAD}^+$  und  $^{18}\text{O}_2$  gemessen wurden.

Das von der SH produzierte  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  könnte Anteile erhalten, die aus der thermischen Zersetzung von Superoxid und  $\text{H}_2\text{O}_2$  infolge der Messbedingungen (SH-Inaktivierung bei  $100^\circ\text{C}$  und Verdampfung des Reaktionsansatzes bei  $160^\circ\text{C}$ ) entstehen. Allerdings war die NADH-abhängige  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ -Produktionsrate der Wildtyp-SH etwa 20- bzw. 258-fach höher als die entsprechenden Produktionsraten für  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Superoxid. Dieses Ergebnis zeigt, dass  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  neben  $\text{H}_2\text{O}_2$  das wichtigste Nebenprodukt im Zuge der  $\text{H}_2$ -abhängigen  $\text{NAD}^+$ -Reduktion in Gegenwart von  $\text{O}_2$  ist. Um zu testen, ob der thermische Zerfall von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Superoxid während der  $\text{H}_2\text{O}$ -Messung eine Rolle spielt, wurden die reduzierten Sauerstoffspezies-Produktionsraten durch das etablierte, ROS-produzierende Enzym Xanthinoxidase bestimmt (Tabelle 15). Die Wasserproduktionsrate war dreimal niedriger als die gesamte ROS-Produktion. Dies deutet darauf hin, dass der thermische Zerfall der ROS keine signifikante Rolle bei der Wasserdetektion spielt.

Um einen Hinweis auf den Ort der  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ -Freisetzung zu erlangen, wurde auch die  $\text{SH}^{\text{FU}}$ -Variante in die Messungen einbezogen. Tatsächlich zeigten alle drei SH-Varianten ähnliche  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ -Produktionsaktivitäten ( $567$ ,  $607$  und  $686 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  für  $\text{SH}^{\text{WT}}$ ,  $\text{SH}^{\text{I64A}}$  und  $\text{SH}^{\text{FU}}$ ). Werden jedoch die Unterschiede der molekularen Massen der eingesetzten Proteine berücksichtigt ( $205 \text{ kDa}$  für  $\text{SH}^{\text{WT}}$ ,  $\text{SH}^{\text{I64A}}$  und  $110 \text{ kDa}$  für  $\text{SH}^{\text{FU}}$ ), besaß die  $\text{SH}^{\text{FU}}$ -Variante mit  $67 \text{ min}^{-1}$  etwa die halbe  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ -Produktionsrate des Wildtyp-Proteins ( $116 \text{ min}^{-1}$ ). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die NADH-abhängige  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ -Produktion sowohl im Hydrogenase- als auch im Diaphorase-Modul der SH erfolgt. Anschließend wurde die Menge der reduzierten Sauerstoffatome infolge der  $\text{O}_2$ -Reduktion mit der Anzahl der in den Reduktionsprodukten gefundenen Sauerstoffatome bestimmt. Molekularer Sauerstoff, Wasserstoffperoxid und Superoxid besitzen im Vergleich zu Wasser die doppelte Anzahl von Sauerstoffatomen. Dies berücksichtigend wurden 68-100% der reduzierten Sauerstoffatome in den Produkten detektiert (siehe Tabelle 14).

### 3.5.8 Orte der $\text{H}_2\text{O}_2$ - und $\text{H}_2\text{O}$ -Produktion in der SH

Die oben gezeigten Experimente deuten darauf hin, dass Wasserbildung als Folge der  $\text{O}_2$ -Reduktion in beiden SH-Modulen stattfindet. Die Superoxidproduktion wird offensichtlich nahezu ausschließlich durch das Diaphorase-Modul katalysiert, während Wasserstoffperoxid



in erster Linie innerhalb des Hydrogenase-Moduls freigesetzt wird. Es ist bekannt, dass reduzierte Flavine die Quelle für ROS einschließlich  $\text{H}_2\text{O}_2$  sind (Massey 1994). Allerdings enthielt gereinigtes  $\text{SH}^{\text{WT}}$ -Enzym nur  $1,00 \pm 0,08$  statt zwei FMN-Moleküle, und das gereinigte Hydrogenase-Modul wies nur geringste Mengen von FMN auf (Kapitel 3.2.7 und 3.3.3). Um zu testen, ob das FMN-a-Molekül im Hydrogenase-Modul der SH für die Bildung von Wasserstoffperoxid verantwortlich ist, wurde die NADH-abhängige  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktionsaktivität in Gegenwart und Abwesenheit von extern appliziertem FMN bestimmt.

**Tabelle 16:  $\text{H}_2\text{O}_2$ - und  $\text{H}_2\text{O}$ -Produktion als Folge der NADH-abhängigen  $\text{O}_2$ -Reduktion in An- bzw. Abwesenheit von extern appliziertem FMN.**

Protein	Netto- $\text{O}_2$ -Reduktion ( $\text{min}^{-1}$ )	$\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion ( $\text{min}^{-1}$ )	$\text{H}_2^{18}\text{O}$ -Produktion ( $\text{min}^{-1}$ )
$\text{SH}^{\text{WT}}$ -FMN	$49 \pm 10$	$14,2 \pm 0,2$	$31,4 \pm 7,0$
$\text{SH}^{\text{WT}}$ +FMN	$94 \pm 17$	$5,8 \pm 0,6$	$122 \pm 8$

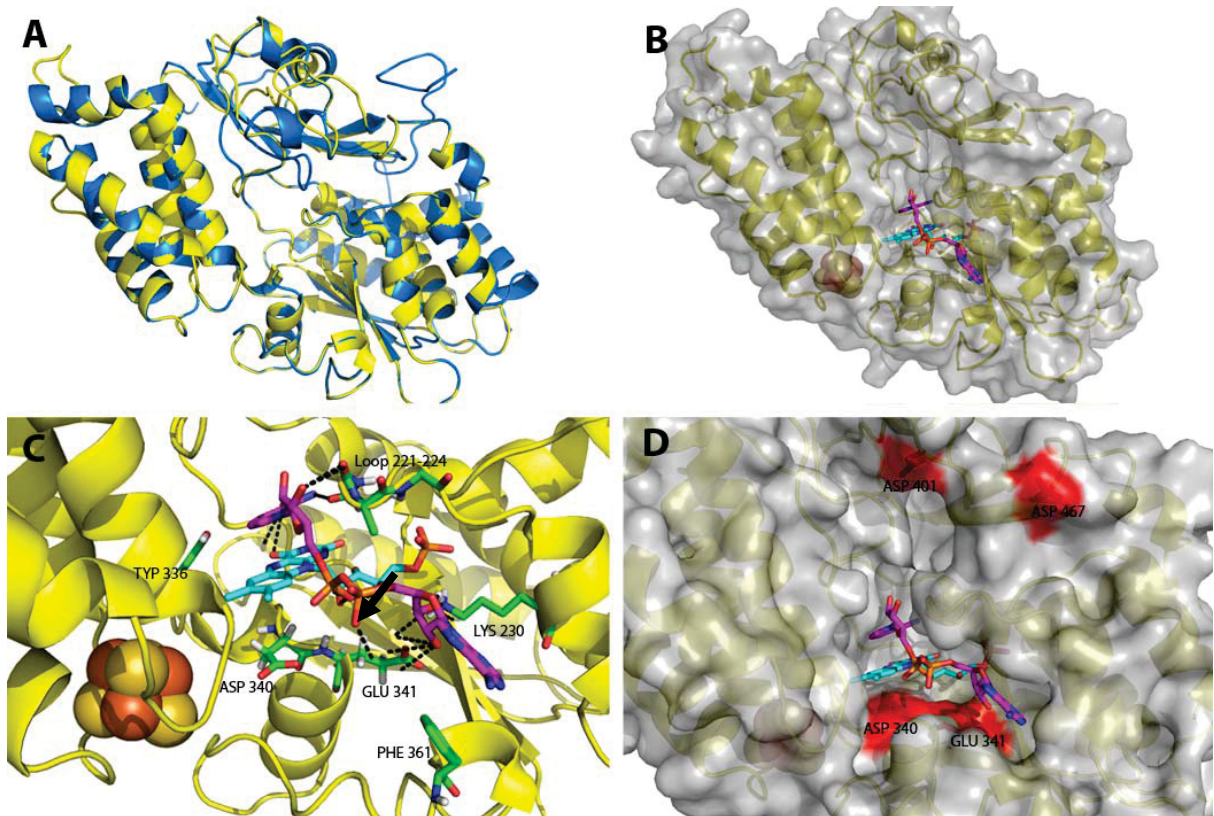
Reduktions-/Produktionsraten wurden in Anwesenheit von 40 %  $\text{O}_2$  gemessen, wie in Material und Methoden beschrieben. Die Werte entsprechen den arithmetischen Mitteln von drei unabhängigen Experimenten. Ebenso sind Standardabweichungen angegeben.

Überraschenderweise sank die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktionsrate von  $14,2 \text{ min}^{-1}$  in Abwesenheit von FMN auf  $5,8 \text{ min}^{-1}$  in Gegenwart von  $1 \mu\text{M}$  FMN. Die Abnahme der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktionsrate in Gegenwart von FMN wurde begleitet von einer signifikanten Zunahme der Produktionsrate von  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  (Tabelle 16). Die  $\text{O}_2$ -Reduktionsrate erhöhte sich in der Anwesenheit von externem FMN auf den doppelten Wert (Tabelle 16). Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Anwesenheit von FMN-a das Produktionsverhältnis von  $\text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}_2$  des Hydrogenase-Moduls der SH in Richtung Wasser verschiebt.

### 3.6 Umwandlung der $\text{NAD}^+$ - in eine $\text{NADP}^+$ -Bindestelle

Für die rationale Mutagenese, wurde zunächst ein Homologiemodell der  $\text{NAD}^+$ -Bindetasche erstellt. Das Diaphorase-Modul der SH weist Ähnlichkeit zu Untereinheiten (Nqo1 und Nqo2) des peripheren Teils von Komplex I aus *Thermus thermophilus* auf, dessen Kristallstruktur bereits bekannt ist (Sazanov und Hinchliffe 2006; Berrisford und Sazanov 2009). Die Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit bzw. -Identität von Nqo1 zu dem N-terminalen Bereich von HoxF, der die  $\text{NAD}^+$ -Bindestelle enthält, betragen dabei 55% bzw. 39%. Diese Struktur (pdb-Zugangscode: 2FUG) diente als Vorbild für die Erstellung eines Homologiemodells (Abbildung 35). Das Modell wurde mit dem automatischen Modus des SWISS-MODEL-Programms erstellt (Arnold *et al.* 2006). Der Qualitätsfaktor „Z-Score“ liegt mit -4.026 in einem für Homologiemodelle, die knapp 400 Aminosäuren umfassen, vertretbaren Bereich (Benkert *et al.* 2011). Das resultierende Homologiemodell für HoxF unterscheidet sich von seinem Vorbild Nqo1 nur in einigen Schleifenregionen und kurzen Teilstücken von  $\alpha$ -Helices. Dabei ist die  $\text{NAD}^+$ -Bindetasche konserviert (siehe Abbildung 35A). Zur Verdeutlichung der

Substratbindung in der kombinierten FMN/NAD(H)-Bindestelle, die sich ihrerseits in einer außergewöhnlichen „Rossmann“-Falte befindet (Sazanov und Hinchliffe 2006), wurden die kokristallisierten Kofaktoren aus der pdb-Struktur 3IAM übernommen sowie die Wasserstoffbrücken zwischen  $\text{NAD}^+$  und der Proteinmatrix des Homologiemodell durch das Programm Pymol berechnet (Abbildung 35BC). Es ist zu erkennen, dass der Isoalloxazin-Ring des FMN den Nikotinamidring des  $\text{NAD}^+$  direkt überlagert und so eine Hydridübertragung ermöglicht (Sazanov und Hinchliffe 2006). Bei der Bindung von NAD(H) in die Bindetasche von HoxF interagiert der Tryptophanrest W336 des Proteins mit der Carbonsäureamidgruppe von NAD(H), das Phenylalanin F361 durch „ $\pi$ -stacking“ mit dem Adeninring und die glycinhaltige Schleife (Loop 221-224) mit den Phosphatgruppen von NAD(H) (Sazanov und Hinchliffe 2006).



**Abb. 35: Homologiemodell der NAD(H)/FMN-Bindestelle in HoxF.** **A:** HoxF (gelb) wurde auf der Basis der Kristallstruktur von Nqo1 (blau, pdb: 2FUG) modelliert. **B:** Homologiemodell von HoxF mit den Kofaktoren NAD(H) und FMN (von pdb: 3IAM). Die Kohlenstoffatome des NADH sind magenta und die von FMN in türkis eingefärbt, Sauerstoffatome besitzen rote, Stickstoffatome blaue und Phosphoratome orange Farbe. Der [4Fe4S]-Cluster ist in roten (Fe) und gelben (S) Sphären darstellt. Die Proteinoberfläche ist grau dargestellt **C:** Vergrößerte Darstellung der NADH/FMN-Bindestelle mit den vermutlich an der NADH-Bindung beteiligten Aminosäuren (grün) (Sazanov und Hinchliffe 2006). Wasserstoffbrücken sind durch schwarze, gestrichelte Linien dargestellt. Die Nummerierung der Aminosäuren entspricht der für das HoxF-Protein. Der schwarze Pfeil markiert die Position von NAD(H), bei der sich im Falle von NADP(H) eine zusätzliche Phosphatgruppe befindet. **D:** Die für die Bindestellenumwandlung ausgetauschten Aminosäuren sind rot markiert.

In der Kristallstruktur von Nqo1 bildet das Glutamat E185 Wasserstoffbrücken mit der Ribose der Adenosin-Einheit des  $\text{NAD}^+$  aus, an der sich im Fall von  $\text{NADP}^+$  eine zusätzliche

Phosphatgruppe befindet (siehe Abbildung 35C, schwarzer Pfeil). Für das benachbarte Glutamat E184 wird ebenfalls ein Beitrag zu der genannten Wasserstoffbrücke vorgeschlagen. Es wird davon ausgegangen, dass die negative Ladung und die Größe dieser beiden Reste, die an analoger Position ebenfalls in der SH präsent sind (D340 und E341), die Bindung von NADP(H) mit seiner negativ geladenen Phosphatgruppe erschweren (Sazanov und Hinchliffe 2006; Berrisford und Sazanov 2009). Um eine bessere Bindung von NADP(H) in der SH zu ermöglichen, sollte daher das Glutamat E341 sowie Aspartat D340 in HoxF durch Mutagenese jeweils durch Alaninreste ersetzt werden.

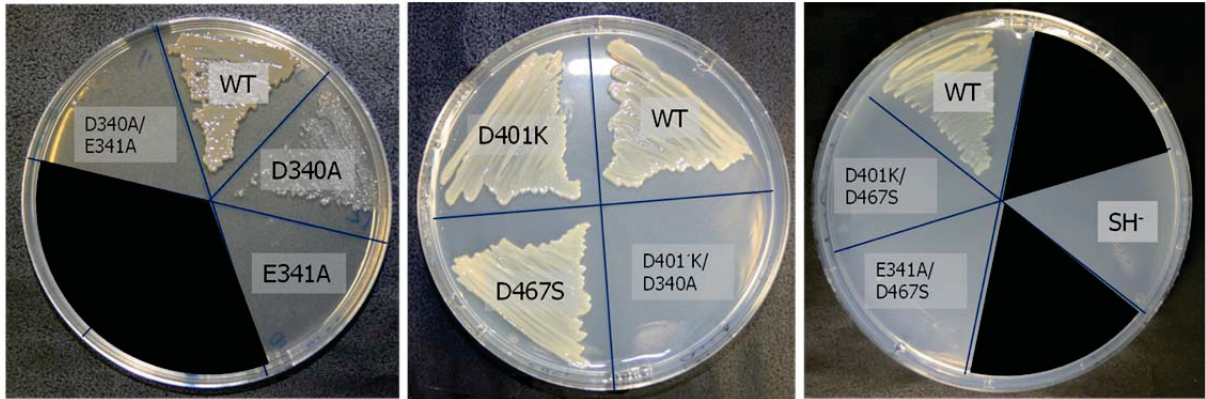
Aminosäureaustausche in einer Monooxygenase fernab der NAD<sup>+</sup>-Bindetasche führten zu einer starken Veränderung in der Substratspezifität (Wu *et al.* 2010). Die gereinigte bidirektionale Hydrogenase aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 kann sowohl NADH als auch NADPH zur Wasserstoffproduktion benutzen (Schmitz *et al.* 2002). Um die katalytische Effizienz der wasserstoffabhängigen NADP<sup>+</sup>-Reduktion der SH zu verbessern, wurden daher zwei negativ geladene, exponierte Aminosäuren in der Nachbarschaft der NAD(H)-Bindestelle gegen Lysin (D401K) und Serin (D467S) ausgetauscht (Abbildung 35D, Sequenzvergleich Abbildung 23). Diese befinden sich in den bidirektionalen Hydrogenasen des Cyanobakterien an äquivalenter Position.

### 3.6.1 Konstruktion der HoxF-Derivate und Funktionalitätstest

Für die Produktion und Reinigung der SH-Varianten mit Aminosäureaustauschen in der NAD(H)-Bindetasche wurde ein Plasmid eingesetzt, das die Gene *hoxFUYHWIhypA2B2F2CDEXA* unter der Kontrolle des nativen SH-Promotors trägt. In diesem Fall wurde das 5'-Ende des *hoxY*-Gens mit einer den *Strep*-tag II codierenden Sequenz ausgestattet, um eine mögliche Interferenz des *Strep*-tag II mit der Bindung von NAD(P)(H) in HoxF zu minimieren. Die entsprechenden Mutationen wurden - wie in "Material und Methoden" beschrieben - über die QuikChange-Strategie in die *hoxF*-Sequenz eingebracht. Die resultierenden *hoxF*-Allele codieren für die Proteine HoxF<sup>D467S</sup>, HoxF<sup>D401K</sup>, HoxF<sup>D340A/D401K</sup>, sowie HoxF<sup>E341/D467S</sup>. Die entsprechenden SH-Derivate wurden demzufolge SH<sup>D467S</sup>, SH<sup>D401K</sup>, SH<sup>D340A/D401K</sup> sowie SH<sup>E341/D467S</sup> genannt. Die aus der Mutagenese resultierenden Plasmide wurden konjugativ in den *R. eutropha*-Stamm HF210 übertragen. Um die Funktionalität der resultierenden SH-Derivate zu testen, wurden die Transkonjuganten zunächst auf ihre Fähigkeit untersucht, lithoautotroph, d. h. auf festem Minimalmedium mit einem Gasgemisch aus H<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> zu wachsen. Als Kontrollstämme dienten *R. eutropha*-HF210-Derivate die zum einen ein analog konstruiertes Überexpressionssysplasmid mit der *hoxF*-Wildtypsequenz (Positivkontrolle) und zum anderen kein Plasmid (Negativkontrolle)



enthielten. Die Stämme, die die Proteine  $\text{SH}^{\text{D467S}}$  und  $\text{SH}^{\text{D400K}}$  synthetisieren, wuchsen vergleichbar schnell wie die Wildtypkontrolle, der  $\text{SH}^{\text{D340A}}$ -Stamm wuchs verlangsamt (Abbildung 36). Die anderen Mutantenstämme waren dagegen nicht in der Lage, lithoautotroph zu wachsen. Auch die Doppelmutante, die das  $\text{SH}^{\text{D401K/D467S}}$ -Protein kodiert, war ebenfalls nicht mehr in der Lage, unter diesen Bedingungen zu wachsen.

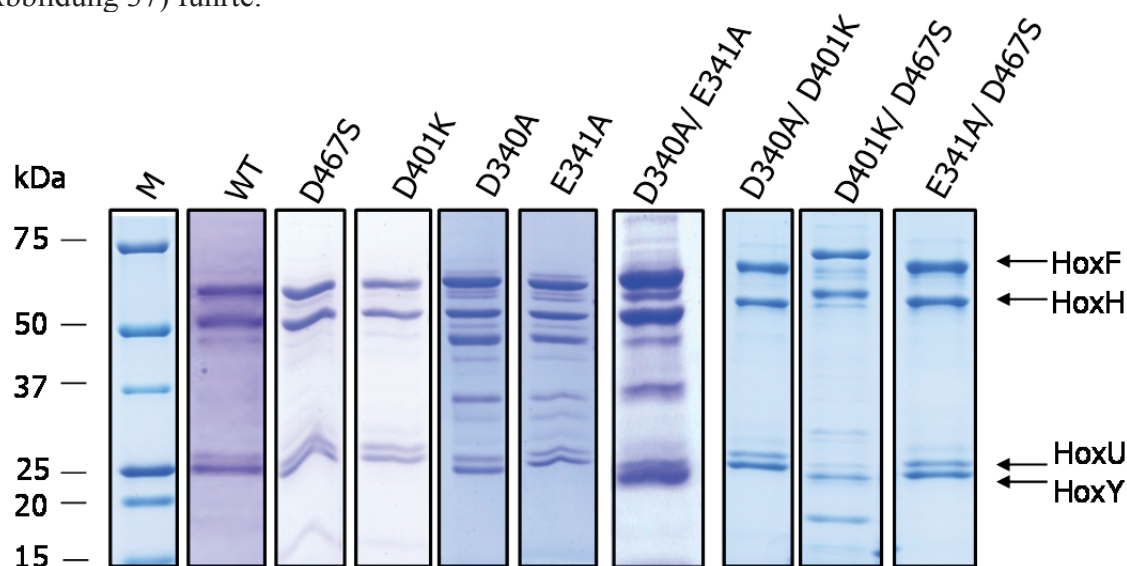


**Abb. 36: Lithoautotrophes Wachstum der *R. eutropha* -Stämme mit SH-Derivaten nach 7 Tagen.** Als Negativkontrolle ( $\text{SH}^-$ ) diente *R. eutropha* HF210 und als Positivkontrolle (WT) *R. eutropha* HF210 mit pGE750. Die SH-Derivate mit angegebenen Aminosäureaustauschen in HoxF wurden auf einem analogen Plasmid codiert und ebenfalls in *R. eutropha* HF210 konjugativ übertragen.

### 3.6.2 Reinigung der SH-Derivate und Bestimmung der Affinität für NAD(P)(H)

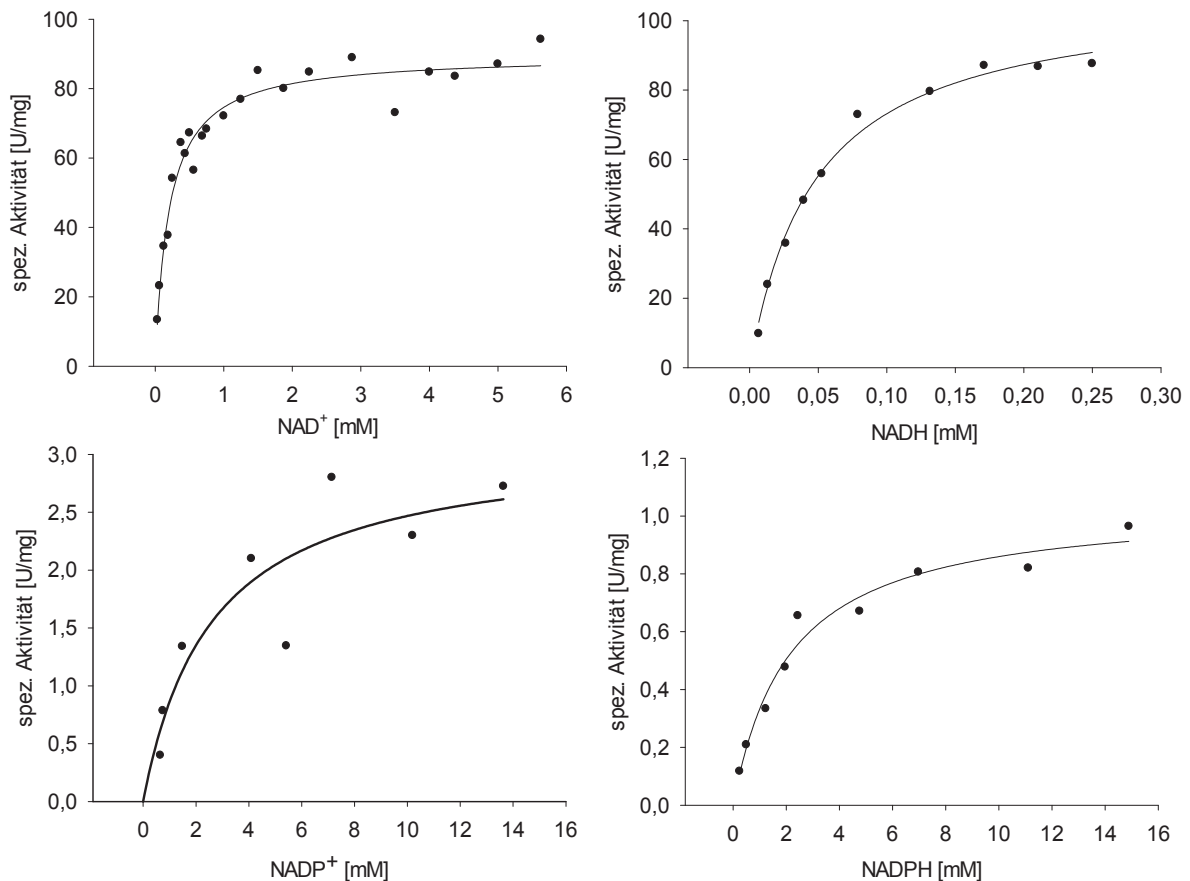
Um die SH-Derivate hinsichtlich ihrer Fähigkeit zu untersuchen,  $\text{NAD(P)}^+$  mit  $\text{H}_2$  zu reduzieren bzw.  $\text{NAD(P)H}$  zu oxidieren, wurden die entsprechenden *R. eutropha*-Mutanten in FGN-Medium kultiviert und die SH-Proteine anschließend mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie gereinigt. Um einen Einfluss der HoxI-Untereinheit, für die eine potenzielle NADPH-Bindung angenommen wurde (Burgdorf *et al.* 2005), zu vermeiden, wurden die SH-Derivate durch Einsatz einer höheren Ionenstärke und leicht alkalischem pH im Verlauf der Reinigung in ihrer heterotetrameren Form, d. h. ohne HoxI-Untereinheiten, isoliert (Abbildung 37). Die Proteine  $\text{SH}^{\text{WT}}$ ,  $\text{SH}^{\text{D467S}}$ ,  $\text{SH}^{\text{D401K}}$ ,  $\text{SH}^{\text{D340A/D401K}}$  sowie  $\text{SH}^{\text{E341/D467S}}$  wurden bis zur Homogenität gereinigt. Die Ausbeute entsprach derjenigen, die mit dem SH-Derivat erzielt wurde, welches den *Strep-tag* II am N-terminus von HoxF trägt (Tabelle S2). Das Derivat  $\text{SH}^{\text{D401K/D467S}}$  konnte jedoch nicht gereinigt werden. Vermutlich führt der Doppelaustausch zu instabilem Protein, was auch die Unfähigkeit des zugehörigen Stammes erklärt, lithoautotroph zu wachsen. Im Gegensatz zu den Proteinen  $\text{SH}^{\text{WT}}$ ,  $\text{SH}^{\text{D467S}}$ ,  $\text{SH}^{\text{D401K}}$ ,  $\text{SH}^{\text{D340A/D401K}}$  und  $\text{SH}^{\text{E341/D467S}}$ , die auf dem Weit-Wirtsbereich-Plasmid pEDY309 kodiert sind, wurden die Derivate  $\text{SH}^{\text{D340A}}$ ,  $\text{SH}^{\text{E341A}}$  und  $\text{SH}^{\text{D340A/E341A}}$  auf der Basis von pCM62 konstruiert, welches ein verkleinertes Derivat von des RK2-Abkömmlings pEDY309 darstellt (Marx und Lidstrom 2001). Das Plasmid pCM62 besitzt offensichtlich eine geringere Stabilität als pEDY309 (O. Lenz, persönliche Mitteilung), was zu einer geringeren

Proteinausbeute (Tabelle S2) und einer erhöhten Präsenz von kontaminierenden Proteinen (Abbildung 37) führte.



**Abb. 37: Reinigung von SH-Derivaten mit Aminosäuresubstitutionen in HoxF.** Die Auftrennung (jeweils 5 µg) erfolgte in 12 %-igen SDS-PAGE-Gelen und die Färbung mit Coomassie-Blau. Die Größen eines Standard-Protein-Markers ist in Spur M in kDa angegeben. Pfeile deuten auf die Laufhöhen von HoxF, H, U und Y hin.

Anschließend wurden die kinetischen Enzymparameter bestimmt (Abbildung 38, Tabelle 17). Die Bestimmung der  $K_M$ - und  $k_{cat}$ -Werte für  $NAD^+$  und  $NADP^+$  beruhte auf der wasserstoffabhängigen Reduktion der Substrate, die photometrisch verfolgt wurde. Die entsprechenden Parameter für NAD(P)H basierten auf der NAD(P)H-abhängigen Reduktion von Benzylviologen, die ebenfalls photometrisch erfasst wurde. Eine exemplarische Messreihe zur Bestimmung der Enzymparameter für die vier Substrate  $NAD^+$ ,  $NADP^+$ , NADH und NADPH ist in Abbildung 38 gezeigt. Zunächst wurden die SH-Derivate auf ihre Aktivität hinsichtlich der physiologischen Substrate  $NAD^+$  und NADH überprüft. Das mit einem *Strep*-Tag II an HoxY versehene  $SH^{WT}$ -Protein wies dabei vergleichbare Enzymparameter auf, wie das  $SH^{WT}$ -Protein mit *Strep*-tag II an HoxF und Wildtyp-SH. Die Derivate  $SH^{D340A/D401K}$  und  $SH^{D467S}$  wiesen eine um die Hälfte geringe  $NAD^+$ -Reduktions-Aktivität als der Wildtyp auf, die Aktivität des  $SH^{E341A}$ -Proteins war sogar um das 250-fache geringer (siehe Tabelle 17). Es fiel auf, dass der  $K_M(NAD^+)$  des  $SH^{D340A}$ -Derivats mit 0,07 mM um den Faktor acht niedriger war als der des Wildtypproteins (0,55 mM). Das Mutantenprotein  $HoxF^{D340A/E341A}$  zeigte keine messbare  $NAD^+$ -Reduktionsaktivität, allerdings war die NADH-Oxidationsaktivität noch zu etwa 20% vorhanden. Im Falle der NADH-Oxidation betrug der  $k_{cat}$  der Derivate  $SH^{D340A}$  und  $SH^{E341A}$  nur etwa 15% der Wildtyp-Umsatzrate.



**Abb. 38: Bestimmung der enzymkinetischen Parameter für das SH<sup>D401K</sup>-Protein.** Die Substratkonzentration wurde variiert und die spezifische SH-Aktivität bestimmt. Die Bestimmung der  $k_{cat}$ - und  $K_M$ -Werte (Tabelle 15) wurden durch nicht-lineare Regression durchgeführt. Das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) für die Angleichungskurve mit NAD<sup>+</sup>, NADH, NADP<sup>+</sup> bzw. NADPH als Substrat betrug 0,952, 0,991, 0,815 und 0,969.

Im Anschluss wurden die enzymkinetischen Parameter für NADP<sup>+</sup> sowie NADPH bestimmt. Bemerkenswerterweise stieg die Affinität für NADPH der SH<sup>E341A</sup>- und SH<sup>D467S</sup>-Derivate auf das 21- bzw. 33-fache der Affinität für das Wildtypprotein (7,0 mM). Die Kombination dieser beiden Austausche im SH<sup>E341A/D467S</sup>-Protein führte jedoch zu keiner weiteren Erhöhung der Affinität. Dagegen resultierte die Kombination der Substitutionen D340A und E341A in einer mehr als 200-fach verbesserten Affinität für NADPH bei einer nur um 70 % reduzierten Umsatzrate. Der synergetische Effekt dieser beiden Austausche führt somit zu einer 70-fach höheren katalytischen Effizienz des SH<sup>D340A/E341A</sup>-Proteins, verglichen mit dem Wildtyp-Enzym.



**Tabelle 17: Umsatz von und Affinität für NADP(H) der gereinigten SH-Derivate.**

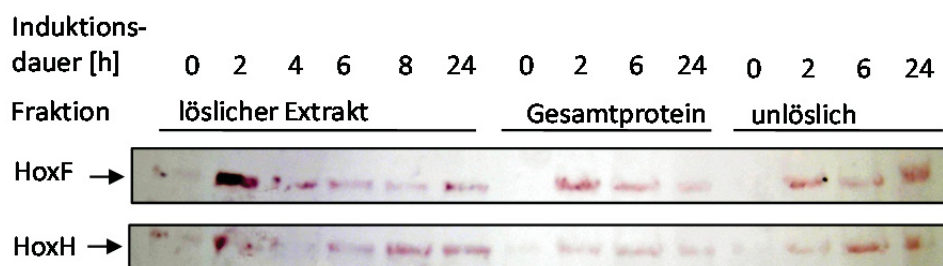
SH-Derivat <sup>a</sup>	NADH			SH-Derivat <sup>a</sup>	NADPH		
	K <sub>M</sub> (mM)	k <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> /K <sub>M</sub> [mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]		K <sub>M</sub> [mM]	k <sub>cat</sub> [s <sup>-1</sup> ]	k <sub>cat</sub> /K <sub>M</sub> [mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
SH <sup>Strep HoxY</sup>	0,129	563,0	4360	SH <sup>Strep HoxY</sup>	7,06	8,9	1,3
SH <sup>E341A</sup>	0,042	77,1	1840	SH <sup>E341A</sup>	0,21	8,7	59,0
SH <sup>D340A</sup>	0,083	87,0	1050	SH <sup>D340A</sup>	5,43	10,0	1,8
SH <sup>D340A/E341A</sup>	0,086	87,0	1011	SH <sup>D340A/E341A</sup>	0,03	2,6	92,3
SH <sup>D401K</sup>	0,038	293,7	7730	SH <sup>D401K</sup>	1,95	3,3	1,7
SH <sup>D467S</sup>	0,068	385,5	5670	SH <sup>D467S</sup>	0,33	1,6	5,0
SH <sup>D401K/D340A</sup>	0,056	111,0	1970	SH <sup>D401K/D340A</sup>	0,83	9,0	10,8
SH <sup>E341A/D467S</sup>	1,000	156,8	110	SH <sup>E341A/D467S</sup>	0,21	3,8	18,6
SH <sup>Strep SH</sup>	0,074	390	5270	SH <sup>Strep SH</sup>	5,41	8,5	1,6
SH-Derivat <sup>a</sup>	NAD <sup>+</sup>			SH-Derivat <sup>a</sup>	NADP <sup>+</sup>		
	K <sub>m</sub> [mM]	k <sub>cat</sub> [sec <sup>-1</sup> ]	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> [mM <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup> ]		K <sub>m</sub> [mM]	k <sub>cat</sub> [sec <sup>-1</sup> ]	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> [mM <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup> ]
SH <sup>Strep HoxY</sup>	0,55	689	1253	SH <sup>Strep HoxY</sup>	>20	<0,1	-
SH <sup>E341A</sup>	0,68	2,7	4,0	SH <sup>E341A</sup>	16,3	8,8	0,5
SH <sup>D340A</sup>	0,07	13,5	13,8	SH <sup>D340A</sup>	4,4	6,4	1,5
SH <sup>D340A/E341A</sup>	>20	<0,1	-	SH <sup>D340A/E341A</sup>	>20	<0,1	-
SH <sup>D401K</sup>	0,202	269,1	1332,2	SH <sup>D401K</sup>	4,5	9	2
SH <sup>D467S</sup>	0,405	219,9	543,0	SH <sup>D467S</sup>	8,6	8,5	1,0
SH <sup>D340A/D401K</sup>	0,121	218	1801,0	SH <sup>D340A/D401K</sup>	7,3	4,1	0,6
SH <sup>E341A/D467S</sup>	0,2	86,2	260	SH <sup>E341A/D467S</sup>	7,8	7,7	1
SH <sup>Strep HoxF</sup>	0,56	540	964	SH <sup>Strep HoxF</sup>	>20	<0,1	-

<sup>a</sup> Für die NAD(P)<sup>+</sup>-Reduktion diente Wasserstoff als Elektronendonator, für die NAD(P)H-Oxidation wurde Benzylviologen als Elektronenakzeptor eingesetzt. Mit Ausnahme des SH<sup>StrepHoxF</sup>-Enzyms tragen alle SH-Derivate einen *Strep*-tag II am N-terminalen Ende von HoxY.

Für die Kofaktorregeneration sind besonders die enzymatischen Parameter für den Umsatz von NADP<sup>+</sup> interessant. Das Wildtypenzym zeigte keine H<sub>2</sub>-vermittelte NADP<sup>+</sup>-Reduktionsaktivität. Deutlich messbare Umsatzraten mit Werten zwischen 4.1 und 9.0 s<sup>-1</sup> wurden dagegen für die SH-Derivate SH<sup>D340A</sup>, SH<sup>E341A</sup>, SH<sup>D401K</sup> und SH<sup>D467S</sup>, SH<sup>D340A/D401K</sup> und SH<sup>E341A/D467S</sup> gemessen. Die K<sub>M</sub>-Werte für NADP<sup>+</sup> (4,4 – 16,3 mM) waren dabei um eine Größenordnung höher als der K<sub>M</sub>(NAD<sup>+</sup>) für die Wildtyp-SH (0,550 mM). Die katalytische Effizienz für NAD<sup>+</sup> bzw. NADH des SH<sup>E341A/D467S</sup>-Derivates erniedrigte sich im Vergleich zur SH-Wildtyp um den Faktor 4 bzw. 60, während sich die katalytische Effizienz für NADPH um den Faktor 14 erhöhte und die für NADP<sup>+</sup> auf von unter 0,01 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> auf 1 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> anstieg. Dies verdeutlicht eine Präferenzverschiebung von NAD(H) zu NADP(H).

### 3.7 Heterologe SH-Produktion in *Pseudomonas putida*

Für die wasserstoffabhängige *in vivo*-Kofaktorregeneration in *P. putida* KT2440 wurde das SH-Expressionsplasmid pLL1 konstruiert, das die heterologe SH-Synthese erlaubt.



**Abb. 39: Immunologischer Nachweis der heterolog produzierten SH-Untereinheiten HoxF und HoxH in *P. putida*.** Rekombinante *P. putida* Stämme wurden bei einer  $OD_{600nm}$  von 4 mit DCPK induziert und die SH-Produktion wurde durch einen immunologischen Nachweis verfolgt. Eingesetzt wurden Antiseren gegen HoxH und HoxF. Löslicher Extrakt und Gesamtprotein (gekochte Zellen; jeweils 20  $\mu$ g Protein) wurden zuvor in einem 4-20 % SDS-PAGE- Gel getrennt.

Die Gene *hoxFUYHWHypA2B2F2CDEX* auf pEDY309 wurden unter die Kontrolle des *alkB*-Promotors gesetzt, um die SH-Genexpression durch n-Alkane oder durch das nichtmetabolisierbare Alkan-Analogon Dicyclopropylketon (DCPK) induzieren zu können.

Das Plasmid pLL1 wurde konjugativ in einen *P. putida* KT2440-Stamm transferiert, der ein weiteres Plasmid enthielt, welches die Monooxygenase CYP153 aus *Polaromonas sp.* Stamm JS666 codiert. Diese Monooxygenase katalysiert die Oxidation von n-Octan zu Octanol (Schepps *et al.* 2011). Nach Wachstum des transkonjuganten Stammes in Glukose-Glycerin-Minimalmedium bis zu einer  $OD_{600}$  von ungefähr 4 wurde die SH-Synthese durch Zugabe von DCPK induziert. 2 h nach Induktion konnten die großen Untereinheiten des SH-Hydrogenasemoduls (HoxH) sowie des Diaphorase-Moduls (HoxF) im löslichen Extrakt immunologisch eindeutig nachgewiesen werden (Abbildung 39). Die entsprechenden Signale blieben bis zum Ende des Experiments (24 h Induktionsdauer) sichtbar.

**Tabelle 18: Spezifische SH-Aktivität ( $H_2$ :  $NAD^+$  in  $\mu$ mol  $\times$   $min^{-1} \times$   $mg^{-1}$ ) in der löslichen Fraktion von *P. putida* nach Induktion mit DCPK.** Löslicher Extrakt (LE) nach Zellaufschluss und anschließender Ultrazentrifugation.

Induktionszeit [h]	0	2	4	6	8	24
$OD_{600}$	$4,6 \pm 0,7$	$7,3 \pm 0,6$	$8,2 \pm 0,2$	$8,5 \pm 0,8$	$10,5 \pm 1,2$	$6,0 \pm 1,5$
SH-Aktivität	$0,18 \pm 0,06$	$0,37 \pm 0,03$	$0,40 \pm 0,05$	$0,24 \pm 0,10$	$0,32 \pm 0,05$	$0,03 \pm 0,01$

Die spezifische SH-Aktivität, die über die  $H_2$ -abhängige  $NAD^+$ -Reduktion im löslichen Extrakt ermittelt wurde, stieg 2 h nach Induktion auf das Doppelte des Ausgangswertes von 0,18 U/mg an und blieb dann für weitere 6 h nahezu konstant bei ca. 0,4 U/mg (Tabelle 18). Der plasmidfreie Stamm zeigte im selben Zeitraum keine messbare SH-Aktivität. Nach 24 h sank die Hydrogenase-Aktivität auf etwa 7% der Maximalaktivität von 4 h nach Induktion. Dennoch blieben HoxF und HoxH unverändert detektierbar. Der Abfall der optischen Dichte zwischen 8 und 24 h nach Induktion lässt sich mit der Absterbephase erklären, die wahrscheinlich mit der Bildung inaktiver SH-Proteine einherging.

Die Synthese aktiver SH in *P. putida* stellt einen entscheidenden Schritt für die H<sub>2</sub>-abhängige *in vivo*-Kofaktorregenerierung im Rahmen von NADH-abhängigen Biotransformationen dar.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden SH-Derivate mit biochemischen, spektroskopischen und elektrochemischen Methoden mit dem Ziel charakterisiert, die Sauerstofftoleranz der SH zu erklären. Es konnte das damalige Modell der Sauerstofftoleranz der SH mit zwei zusätzlichen CN<sup>-</sup>-Liganden am aktiven Zentrum durch spektroskopische Studien in ganzen Zellen widerlegt werden. Um die komplexen Reaktionsmechanismen der SH in überschaubare Teilreaktionen zu zerlegen, wurden Subkomplexe der SH getrennt voneinander untersucht. Das Zusammenspiel des Hydrogenase- mit dem Diaphorase-Modul erlaubt die Kopplung der Wasserstoffoxidation mit der Reduktion des cytoplasmatischen NAD<sup>+</sup>. Dabei sind die Aktivitäten beider Module fein aufeinander abgestimmt. Die Analyse reduzierter Sauerstoffspezies ermöglichte das Aufstellen eines neuen Modells zur Sauerstofftoleranz der SH. Aufgrund der außergewöhnlichen Sauerstofftoleranz wurden für den biotechnologischen Einsatz der SH in der Kofaktorregenerierung die Substratspezifität zu NADP(H) erweitert und die SH heterolog in *Pseudomonas putida* produziert, um ein zellbasiertes Kofaktorrecycling zu erlauben.

### 4.1 Optimierung der SH-Produktion und Reinigung

Ein neues SH-Überexpressionssystem sowie eine optimierte Kultivierung und Reinigung der SH über *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie wurde erfolgreich in dieser Studie etabliert, um hochaktive, homogene SH-Präparationen in großen Mengen für biochemische und spektroskopische Analysen und für den späteren Einsatz in der Kofaktorregenerierung zu erhalten. Ein Plasmid mit allen SH-Strukturgenen und einer für den *Strep*-tag II codierende Sequenz am 5'-Ende von *hoxF* wurde dafür eingesetzt. Zudem enthielt es das für die Biosynthese der SH notwendige minimale Set aus den 14 Genen *hoxFUYHWIhypA2B2F2CDEXhoxA*, die aus dem SH- und dem MBH-Operon zusammengesetzt wurden und für die Struktur, Maturation sowie Regulation der Transkription notwendig sind (Abbildung 4,5). Eine mikroanaerobe Kultivierung in Minimalmedium, die Reinigung unter oxidierenden Bedingungen sowie der Reinigungspuffer mit neutralem pH und geringer Ionenstärke (5 % Glycerin, 50 mM K-PO<sub>4</sub>, pH 7.0) führten zur Isolierung hochaktiver und heterohexamerer SH. Im Durchschnitt wurden 65 mg SH aus 10 g Zellen (Nassgewicht) erhalten. Die Reinigung erfolgte innerhalb von 4 bis 6 h im Vergleich zu einer 2 bis 3-tägigen Reinigung nach dem klassischen Protokoll mit verschiedenen Chromatographie- und Fällungsschritten (Schneider und Schlegel 1976; van der Linden *et al.* 2006). Die Ausbeute war zudem mehr als 10-fach höher als zuvor für die SH beschrieben

(Schneider und Schlegel 1976; van der Linden *et al.* 2006). Außerdem sind die Ausbeuten mehr als 20-fach höher als die Ausbeuten, die für die bidirektionale Hydrogenas aus *Synechocystis* PCC 6803, für SH1 aus *Pyrococcus furiosus* oder die MBH aus *R. eutropha* erzielt wurden (Germer *et al.* 2009; Chandrayan *et al.* 2011; Goris *et al.* 2011). Außerdem konnte die heterotetramere Form der SH gereinigt werden (Kapitel 3.2.3), durch eine höhere Ionenstärke und leicht alkalischen pH-Werts des Reinigungspuffers konnte HoxI<sub>2</sub> vom SH-Holoenzym entfernt werden, wie es bereits in der Literatur gezeigt wurde (Burgdorf *et al.* 2005).

Die folgenden drei Punkte führten zu einer gesteigerten SH-Produktion durch Induktion des nativen SH-Promotors: (1) Das Wachstum mit einer schlechten Kohlenstoffquelle wie Glycerin führte dazu, dass die SH-Gentranskription dereprimiert wurde und dadurch SH produziert wurde (Friedrich 1982; Schwartz *et al.* 1998). (2) Das Gen, für den Transkriptionsaktivator HoxA wurde in das SH-Überproduktionsplasmid eingebaut und somit ein Gendosis-Effekt erzeugt (Lenz und Friedrich 1998). (3) Es wurde eine mikraerobe Kultivierung durchgeführt. Dabei ist anzumerken, dass mittels „*in silico*“-Methoden im Bereich des SH-Promotors Bindestellen des globalen, O<sub>2</sub>-sensierenden Transkriptionsregulators FNR identifiziert wurden (Anne Pohlmann, persönliche Mitteilung). Die volumetrische SH-Ausbeute von 19,5 mg/l liegt in der Größenordnung von heterologen *E. coli* Batch-Expressionssystemen für Standardproteine (Siurkus *et al.* 2010), jedoch fällt aufgrund der langen Kultivierung von 168 h die Raum-Zeit-Ausbeute mit 0,11 mg/l/h sehr gering aus. Die spezifische Aktivität (H<sub>2</sub>:NAD<sup>+</sup>) der gereinigten SH betrug im Durchschnitt 137 U/mg und liegt damit doppelt so hoch wie bei früheren Reinigungen (Schneider und Schlegel 1976). Das gereinigte Enzym wies eine „lag-Phase“ auf (Schneider und Schlegel 1976). Erst nach autokatalytischer Reaktivierung zeigt die SH eine wasserstoffabhängige NAD<sup>+</sup>-Reduktionsaktivität. Zu Beginn produziert vermutlich eine aktive Enzympopulation wasserstoffabhängig NADH, welches für die Reaktivierung von inaktiven Enzymmolekülen verantwortlich ist (Schneider und Schlegel 1976). Für die hier durchgeführten SH-Aktivitätsbestimmungen wurde NAD<sup>+</sup> in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt. Höhere NAD<sup>+</sup>-Konzentrationen führen zu einer längeren „lag-Phase“, da das autokatalytisch produzierte NADH verdünnt wird (Schneider und Schlegel 1976). Allerdings führt eine höhere Konzentration von NAD<sup>+</sup> zu gesteigerten Aktivitäten, da die Affinität für NAD<sup>+</sup> (K<sub>m</sub>-Wert von 0,5 mM) gering ist. In der Studie von van der Linden *et al.* 2006 wurden für die SH-Aktivitätsmessung 5mM NAD<sup>+</sup> eingesetzt und damit SH-Aktivitäten von 150-185 U/mg erzielt, die **der Michaelis-Menten-Kinetik folgend nahe an „v<sub>max</sub>“ liegen**. Der Einsatz von 5

mM  $\text{NAD}^+$  im Gegensatz von 1 mM  $\text{NAD}^+$  führte zu ungefähr 50% höheren Aktivitäten und erklärt somit die gesteigerten Aktivitäten in der Studie von van der Linden *et al.* 2006 im Gegensatz zu den hier gemessenen Aktivitäten von 137 U/mg mit  $\text{NAD}^+$  (Kapitel 3.2.3).

#### 4.2 Kofaktorzusammensetzung

Wie bereits in der Literatur beschrieben, wurde die Aktivität der homolog produzierten SH bei einer Sauerstoffkonzentration von 60 % nur um ca. 20 % inhibiert (Kapitel 3.5.3; Schneider und Schlegel 1981). Entsprechend der Metallbestimmung, den Sequenzvergleichen und den spektroskopischen Untersuchungen (UV-Vis und EXAFS) der nativen SH und ihrer Submodule besitzt die SH vier [4Fe4S]-Cluster und einen [2Fe2S]-Cluster (Kapitel 3.2.7; 3.3.3.; 3.4.4). Das Enzym wies eine Fe-S-Cluster-Zusammensetzung auf, wie sie von Albracht und Hedderich 2000 prognostiziert wurde. Für die SH konnte ein FMN bestimmt werden (Kapitel 3.2.7). Dies stimmt mit den Literaturdaten überein (Schneider und Schlegel 1976). Allerdings zeigten Rekonstitutionsexperimente, dass die SH zwei FMN-Moleküle binden kann (Schneider und Schlegel 1978). Dabei bindet das Diaphorase-Modul das FMN-b-Molekül (Kapitel 3.4.4; Schneider und Schlegel 1978). Das zweite FMN (FMN-a) geht vermutlich während der Reinigung leicht verloren (van der Linden *et al.* 2004). In dieser Arbeit wurde aus den folgenden Resultaten erstmals geschlussfolgert, dass sich FMN-a im Hydrogenase-Modul befindet: (1) FMN wurde darin in substöchiometrischen Mengen detektiert. (2) FMN steigerte die  $\text{H}_2$ -Oxidationsaktivität des Hydrogenase-Moduls, (3) die Semichinonform des FMN konnte nach Reduktion mit Dithionit durch UV-Vis-Spektroskopie nachgewiesen werden und (4) zugefügtes FMN hatte zudem einen stabilisierenden Effekt auf das [NiFe]-Zentrum, was durch FTIR-Spektroskopie gezeigt wurde.

Der Nachweis von Kupfer (1,4 pro Enzym) im Hydrogenase-Modul der SH aus *R. eutropha* steht in Übereinstimmung mit den 0,63 Kupferatomen, die zuvor im Hydrogenase-Modul der nah verwandten SH aus *Rhodococcus opacus* ermittelt wurden (Schneider *et al.* 1984). Die vergleichsweise starke Bindung von Kupfer durch das isolierte Hydrogenase-Modul ist wahrscheinlich auf die Exposition von metallbindenden Aminosäuren als Resultat des Entfernens des Diaphorase-Moduls zurückzuführen. Tatsächlich beinhaltet HoxY zusätzlich zu den vier Cysteinen, die vermutlich den [4Fe4S]-Cluster koordinieren, fünf weitere Cysteine sowie fünf Histidin-Reste (Abbildung 13). Die UV-Vis-Spektren des Diaphorase-Moduls weisen nach Reduktion mit Dithionit Signale auf, die sowohl auf neutrales als auch anionisches Semichinon deuten. Dieses könnte mittels EPR-Spektroskopie untermauert werden, für die jedoch die Ausbeute des HoxFU-Proteins gesteigert werden müsste.



Eine neue Entdeckung ist, dass die native SH nach der Affinitätschromatographie als Homodimer vorliegt. Die verschiedenen Fällungs- und Chromatographieschritte während der klassischen Reinigung könnten zu einer Monomerbildung geführt haben (van der Linden *et al.* 2004). Mit der in dieser Arbeit verwendeten Kultivierungs- und Reinigungsmethode wurden reine, homogene und konzentrierte Enzymproben für die biochemischen und infrarotspektroskopischen Untersuchungen präpariert. Darüber hinaus erlaubte die Reinigung über die *Strep-Tactin*-Affinitätschromatographie unter Verwendung des hier etablierten Protokolls eine schnelle Reinigung verschiedener Derivate mit Aminosäureaustauschen in kleinem Maßstab.

#### 4.3 Kontrovers diskutierte Ergebnisse zur Struktur des [NiFe]-Zentrums der SH

Aufgrund der Tatsache, dass gereinigte SH im IR-Spektrum eine CO- und vier CN-Absorptionsbanden aufwies und die chemische Cyanidbestimmung vier Cyanide für die SH ergaben, wurde für das [NiFe]-Zentrum der SH eine modifizierter Struktur im Vergleich zu Standard-[NiFe]-Hydrogenasen angenommen (Happe *et al.* 2000; Bleijlevens *et al.* 2004; Burgdorf *et al.* 2005; van der Linden *et al.* 2006). Dies wurde damit erklärt, dass im Gegensatz zu Standard-[NiFe]-Hydrogenasen jeweils ein zusätzliches Cyanid am Eisen und am Nickel gebunden ist. Letzteres wurde für die Sauerstofftoleranz der SH verantwortlich gemacht. Einige Zweifel kamen jedoch bei der Interpretation der älteren Experimente auf. Die Annahme, eines permanent redoxinaktiven Ni(II) steht im Widerspruch zu dem paramagnetischen Ni<sub>a</sub>-C, das nach Inkubation mit NADH detektiert wurde (Erkens *et al.* 1996). Außerdem wurden im Rahmen spektroelektrochemischer Messungen Ni<sub>a</sub>-SR-Zustände beobachtet, die auch in Standardhydrogenasen vorliegen. Diese Ni<sub>a</sub>-SR-Zustände nach Reduktion wurden auf den Verlust der zusätzlichen Cyanid-Liganden zurückgeführt (Burgdorf *et al.* 2005; van der Linden *et al.* 2006). Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da das Reduktionsmittel NADH ein natürliches Substrat der SH darstellt und ein ähnliches Redoxpotential aufweist wie es für Detektion der Ni<sub>a</sub>-C und für die verschiedenen Ni<sub>a</sub>-SR-Zustände während der spektroelektrochemischen Messungen verwendet wurde (van der Linden *et al.* 2006). Zudem weisen Cyanide, die an Eisen ligandiert sind, eine starke Bindungsenergie auf. Somit ist es eher unwahrscheinlich, dass sie durch die Einstellung milder Reduktionsbedingungen selektiv von dem [NiFe]-Zentrum im Proteininneren dissoziieren. Des Weiteren war die von van der Linden *et al.* (2004) angestellte Interpretation zur partialen Markierung der Cyanide in der SH mit <sup>15</sup>N lückenhaft, was in Horch *et al.* 2012 näher ausgeführt wurde.

Zudem wurde angenommen, dass die IR-Bande bei  $2098\text{ cm}^{-1}$ , die dem Nickel-gebundenen Cyanid zugeordnet wurde, als einzige sensitiv auf strukturelle und potentialabhängige Änderungen während der Reaktivierung und der  $\text{H}_2$  Katalyse reagiert (van der Linden *et al.* 2004; Burgdorf *et al.* 2005; van der Linden *et al.* 2006). Jedoch wiesen die experimentellen IR-Spektren redoxabhängige Intensitätsänderungen in der ganzen Cyanidregion von  $2100\text{--}2050\text{ cm}^{-1}$  auf, was darauf hindeutet, dass nicht nur das Nickel-gebundene Cyanid, sondern mehrere Cyanidliganden ihre Schwingungseigenschaften änderten. Berechnete IR-Spektren der SH unterstützen diese Hypothese (Horch *et al.* 2012). Infolge der Sechsfach-Koordination durch den zusätzlichen Cyanid-Liganden wäre das Eisen nicht mehr in der Lage, an der Bindung eines Brückenliganden im aktiven Zentrum zu partizipieren. Somit kann es auch nicht als initialer Wasserstoffakzeptor agieren, wie es von Kubas 2007 postuliert wurde. Um diese hier aufgeführten Widersprüche zum bisher bestehenden Modell aufzuklären, wurde die SH erneut spektroskopisch untersucht.

#### 4.4 Die SH besitzt einen Standard-Satz von zwei $\text{CN}^-$ - und einem CO-Liganden

Die SH wurde in einem kombinierten IR- und EPR-spektroskopischen Ansatz untersucht. Im Gegensatz zu vorherigen Untersuchungen an gereinigter SH wurde diese Studie in der physiologischen Umgebung der SH, d. h. als Bestandteil des Cytoplasmas durchgeführt. Dafür wurden ganze Zellen des *R. eutropha*-Derivats HF798 eingesetzt, das lediglich die SH synthetisiert und keine RH und MBH mehr bildet (Kapitel 3.1.1). Durch *in vivo* EPR-Spektroskopie wurde gezeigt, dass die SH in Zellen, die in Abwesenheit von  $\text{H}_2$  gezogen wurden, vorwiegend im paramagnetischen  $\text{Ni}_a\text{-C}$ -Zustand vorliegt, der durch ein Hydrid zwischen Nickel und Eisen im aktiven Zentrum gekennzeichnet ist (Kapitel 3.1.2). Bei kryogenen Temperaturen wurde das Proton durch Weißlichtbestrahlung reversibel aus seiner Brückenposition entfernt, wobei sich der  $\text{Ni-L}$ -Zustand einstellte (Brecht *et al.* 2003). Die FTIR-spektroskopischen Untersuchungen an den identisch behandelten Proben führten zur Identifizierung der reduzierten  $\text{Ni}_a\text{-SR}$ -Zustände (Kapitel 3.1.3), die auch in Standard-Hydrogenasen bekannt sind und sich in ganzen Zellen nach Inkubation mit Wasserstoff einstellten. Aerobe wie auch anaerobe Oxidation der Zellen mit  $\text{NAD}^+$  führte dagegen zu einem nahezu homogenen Zustand der SH, der dem  $\text{Ni}_r\text{-B}$ -Zustand in Standard-[NiFe]-Hydrogenasen ähnelt, jedoch im Falle der SH EPR-inaktiv war. Es bleibt noch zu klären, ob dieser  $\text{Ni}_r\text{-B}$ -ähnliche Zustand aufgrund von Spinkopplungen mit einem weiteren paramagnetischen Zentrum EPR-inaktiv ist oder ob es sich lediglich um eine „ $\text{Ni}_r\text{-B}$ -artige“-Spezies mit einem formalen  $\text{Ni(II)}$ -Zustand handelt. Die Reversibilität aller Übergänge zwischen den detektierten Redoxzuständen belegen ein intaktes katalytisches Zentrum. Das

Verschwinden des Ni<sub>a</sub>-C-Signals frisch geernteter Zellen nach Reduktion bzw. nach Oxidation zeigt, dass das Nickel-Atom der SH unter physiologischen Bedingungen redoxaktiv ist und zwischen Ni<sup>II</sup> und Ni<sup>III</sup> wechselt. Diese Daten belegen, dass das [NiFe]-Zentrum der SH einen „Standardsatz“ von einem CO- und zwei CN<sup>-</sup>-Liganden enthält und diesbezüglich der Struktur des aktiven Zentrums von [NiFe]-Standardhydrogenasen gleicht. Das bisherige Modell, welches zwei zusätzliche CN<sup>-</sup>-Liganden postuliert, kann somit verworfen werden. Die Notwendigkeit spektroskopische Untersuchungen an Enzymen in der nativen Umgebung, also innerhalb der Zelle, durchzuführen, wurde in dieser Analyse besonders deutlich. Weiterhin demonstriert diese Studie, dass die Zusammensetzung des Cytoplasmas einen deutlichen Einfluss auf den Redoxzustand des [NiFe]-Zentrums der SH hat. Die SH besitzt in HoxF eine NAD(H)-Bindestelle, über die die SH mit dem cytoplasmatischen NAD<sup>+</sup>/NADH-Pool interagieren kann (Kapitel 3.4). Außerdem kann das [NiFe]-Zentrum der SH mit Wasserstoff und Sauerstoff interagieren (Kapitel 3.3.9 und Kapitel 3.5). In zukünftigen Experimenten könnte die cytoplasmatische NAD<sup>+</sup>- und NADH-Konzentration durch HPLC-MS quantifiziert werden und gleichzeitig durch FTIR der Redoxzustand des [NiFe]-Zentrums bestimmt werden. Bei Kenntnis der Redoxpotentiale der FTIR-detektierten Zustände könnte die SH als Redoxsensor des intrazellulären NAD<sup>+</sup>/NADH-Pools eingesetzt werden (siehe Abbildung 42D).

#### 4.5 Der katalytische Zyklus am Nickel-Eisen-Zentrum der SH

Stabile Intermediate der Wasserstoffumwandlung am [NiFe]-Zentrum können mittels EPR- und IR-spektroskopischer Untersuchungen verfolgt werden. Die Ergebnisse der IR-Untersuchungen an der gereinigten SH sowie dem Hydrogenase-Modul zeigten, dass das [NiFe]-Zentrum der SH nahezu alle redoxaktive Zustände aufweist, die für O<sub>2</sub>-sensitive Standardhydrogenasen bekannt sind (Kurkin *et al.* 2004). Dies ist konsistent mit einem Standardsatz von zwei CN<sup>-</sup>- und einem CO-Liganden. Jedoch gibt es auch einige Besonderheiten, auf die im Folgenden eingegangen werden soll. Die reduzierten Zustände des HoxHY-Subkomplexes (Kapitel 3.3.10) waren weitgehend ähnlich zu denen der nativen SH in ganzen Zellen (Kapitel 3.1.3), obwohl das Ni<sub>a</sub>C-Intermediat nicht detektiert werden konnte. Diese Unterschiede sind wahrscheinlich mit dem fehlenden FMN und dem Fehlen des Diaphorase-Moduls zu erklären, das anscheinend einen starken Einfluss auf das Redoxverhalten des [NiFe]-Zentrums hat, indem es den Elektronentransportweg regelt und die Kopplung mit dem NAD<sup>+</sup>/NADH-Pool herstellt.

Im Gegensatz zu Standardhydrogenasen führte die Inkubation der SH allein mit Wasserstoff zu keiner Reduktion des [NiFe]-Zentrums. Dies bestätigen bereits ältere Studien (Schneider

und Schlegel 1976; Schneider *et al.* 1979). Dagegen führte die Reduktion mit Wasserstoff in Anwesenheit von FMN (im Falle des Hydrogenase-Moduls) und NADH (im Falle der nativen SH) zu der Ausprägung der  $\text{Ni}_a\text{-SR-}$ ,  $\text{Ni}_a\text{-SR}'$ -, und  $\text{Ni}_a\text{-SR}''$ -Zustände (Abbildung 3E, Kapitel 3.2.6 und Kapitel 3.3.10). Ebenso bestätigen die elektrochemischen Experimente mit dem Hydrogenase-Modul, dass eine Reaktivierung des isolierten Enzyms notwendig ist (Kapitel 3.3.6). Ein möglicher katalytischer Zyklus nach Siegbahn *et al.* 2007 ist in Abbildung 3 und Abbildung 31 gezeigt. In frisch geerntete Zellen wurden die reduzierten Redoxzustände  $\text{Ni}_a\text{C}$ ,  $\text{Ni}_a\text{SR}'$  und  $\text{Ni}_a\text{SR}''$  der SH detektiert (Kapitel 3.1.3). Außerdem konnte der  $\text{Ni}_a\text{S}$ -Zustand festgestellt werden, der eine freie Bindestelle für Wasserstoff aufweist (Abbildung 3C; Lubitz *et al.* 2007)). Nach Reduktion mit  $\text{H}_2$  befand sich das  $[\text{NiFe}]$ -Zentrum der SH im  $\text{Ni}_a\text{-SR2}$ -Zustand (Kapitel 3.1.3 und 3.2.6), der bisher ausschließlich in der bidirektionalen  $[\text{NiFe}]$ -Hydrogenase von *Synechocystis sp.* PCC 6803 gefunden wurde (Germer *et al.* 2009). Im Vergleich zu den  $\text{Ni}_a\text{-SR}$ -Redoxzuständen in Standard- $[\text{NiFe}]$ -Hydrogenasen, weist die  $\text{Ni}_a\text{-SR2}$ -Spezies mit  $1958\text{ cm}^{-1}$  eine ungewöhnlich hohe CO-Streckschwingung auf. Eine formale  $\text{Ni}^{\text{III}}$ -Spezies wie beim  $\text{Ni}_a\text{-C}$  oder dem vermeintlichen  $\text{Ni}_a\text{-X}$ -Zustand im Modell der oxidativen Addition (siehe Kapitel 1.4; Lill und Siegbahn 2009) können ausgeschlossen werden, da mit dem Auftreten des  $\text{Ni}_a\text{-SR2}$ -Zustandes kein EPR-Signal des Nickels detektiert wurde (Kapitel 3.1.3 und Kapitel 3.2.6). Eine  $\text{Ni}^{\text{II}}$ -Spezies, bei der der austauschbare Ligand zwischen Nickel und Eisen in "trans"-Position zu dem CO-Liganden einen starken Effekt auf die Streckschwingung des CO-Liganden ausübt, ist eher wahrscheinlich (Horch *et al.* 2012). Ein „Trans-Effekt“ taucht u. a. auf, wenn sich zwei Liganden ein Metallorbital teilen (Cotton und Wilkinson 1988). In  $[\text{NiFe}]$ -Hydrogenasen würde sich ein verbrückender Ligand das  $d_{22}$ -Orbital des Eisens mit dem CO teilen. Das Hydrid in  $\text{Ni}_a\text{-C}$  fungiert als guter „Sigma-Donor“, schwächt die Fe-CO Bindung und stärkt somit die Dreifachbindung des CO. Daher liegt die CO-Streckschwingung des  $\text{Ni}_a\text{-C}$ -Zustandes im Vergleich zu der vom  $\text{Ni}_a\text{-S}$  bei höheren Wellenzahlen (Volbeda und Fontecilla-Camps 2005). Für den  $\text{Ni}_a\text{-SR}$ -Zustand wurde im Rahmen von DFT-Berechnungen ebenfalls ein Hydrid als Brückenligand vorgeschlagen (Siegbahn *et al.* 2007). Eine Protonierung des verbrückenden Hydrides von  $\text{Ni}_a\text{-SR}$  oder die Reaktion von  $\text{Ni}_a\text{-S}$  mit Wasserstoff würde zu einem  $\text{H}_2$ -Sigmakomplex am Eisen als Intermediat führen (siehe Abbildung 3D). Dabei vermitteln die zwei Elektronen der  $\delta(\text{H-H})$ -Bindung gleichzeitig die Bindung zum Eisen. Dadurch wird die Fe-CO-Bindung geschwächt und die Wellenzahl der CO-Streckschwingung steigt (Niu *et al.* 1999; Kubas 2007). Die Erhöhung der Frequenz der Streckschwingung des CO-Liganden von  $1946\text{ cm}^{-1}$  im  $\text{Ni}_a\text{-SR}$ -Zustand auf  $1958\text{ cm}^{-1}$  im  $\text{Ni}_a\text{-SR2}$ -Zustand spricht

entweder ebenfalls für ein Hydrid als Brückenligand (Siegbahn *et al.* 2007) oder für einen H<sub>2</sub>-Sigmakomplex am Eisen (Horch *et al.* 2012). Das gebundene H<sub>2</sub>-Molekül des H<sub>2</sub>-Sigmakomplexes würde dann heterolytisch am [NiFe]-Zentrum gespalten werden (siehe Abbildung 3D zu 3E), wobei Nickel die redoxaktive Spezies ist und sich die Oxidationsstufe des „low-spin“ Fe<sup>II</sup> nicht ändert. Reversible H<sub>2</sub>-Sigmapbindungen, bei denen sich der Redoxzustand des Übergangsmetalls nicht ändert, konnten auch für Ruthenium-Komplexe beobachtet werden. (Grellier *et al.* 2007; Perutz und Sabo-Etienne 2007). Entsprechend dem Modell von Siegbahn und Kollegen würde nach heterolytischer Wasserstoffspaltung des H<sub>2</sub>-Sigmakomplexes das Hydrid als Brückenligand zwischen Nickel und Eisen vorliegen und ein Proton auf das terminale Cystein des Nickels übertragen werden. Dieser Zustand wird als Ni<sub>a</sub>-SR bezeichnet (Abbildung 3E; Siegbahn *et al.* 2007). Anschließend würde das Proton an das benachbarte Glutamat (Glu14 im Falle von HoxH) und ein Elektron auf die FeS-Cluster übertragen werden (Abbildung 3F/G). Für die Ni<sub>a</sub>-SR-, Ni<sub>a</sub>-SR'- und Ni<sub>a</sub>-SR''-Spezies bleibt die Frage offen, ob sie sich in der Protonierung, Konformation oder zusätzliche H<sub>2</sub>- oder H'-Liganden unterscheiden (Volbeda *et al.* 2005; Fichtner *et al.* 2006; Ogata *et al.* 2009).

Die isolierte heterohexamere SH zeigte nach Reduktion mit einem Überschuss von NADH vorwiegend den Ni<sub>a</sub>-C-Zustand (Kapitel 3.2.6), der ein Hydrid als Brückenligand aufweist (Abbildung 3H). Nach weiterer Reduktion mit Wasserstoff verschwand dieser wieder (Kapitel 3.2.6). Der EPR-aktive Ni<sub>a</sub>-C-Zustand tritt nur in einem kleinen Redoxpotentialfenster von -290 bis -325 mV auf (Erkens *et al.* 1996). Dies erklärt, dass dieser Zustand in vorherigen Untersuchungen leicht übersehen werden konnte (Happe *et al.* 2000; van der Linden *et al.* 2004; Löscher *et al.* 2005; van der Linden *et al.* 2006). Für den Übergang von Ni<sub>a</sub>-C mit Ni<sup>III</sup> zu Ni<sub>a</sub>-S mit Ni<sup>II</sup> wurde ein Ni<sup>I</sup> Intermediat postuliert, das als Ni<sub>a</sub>-R\* bezeichnet wurde (Lill und Siegbahn 2009). Laut dem Modell von Lill und Mitarbeitern würde das Hydrid von der verbrückenden Position im Ni<sub>a</sub>-C als Proton auf ein terminales Cystein transferiert werden. Die verbleibenden zwei Elektronen vom Hydrid würden dadurch das Ni<sup>III</sup> zu Ni<sup>I</sup> reduzieren (Abbildung 3H zu Abbildung 3I). Entweder scheint Ni<sub>a</sub>-R\* sehr kurzlebig zu sein, so dass es bis jetzt spektroskopisch noch nicht detektiert wurde, oder Ni<sub>a</sub>-R\* könnte ähnlich zu Ni-L sein. Bei der SH wurde ebenfalls ein Ni-L-Zustand detektiert, der durch Belichtung mit Weißlicht bei kryogenen Temperaturen induziert wurde, so wie auch bei fast allen anderen bislang untersuchten Hydrogenasen (Lubitz *et al.* 2007). Bei einigen Hydrogenasen taucht ein Ni-L-Zustand sogar bei weit höheren Temperaturen auf. Ein dem Ni-L ähnlicher Zustand erscheint bei der „Uptake“ Hydrogenase aus *Acidithiobacillus ferrooxidans* und bei früheren MBH-Präparationen bei Raumtemperaturen und bei der RH bei 200 K (Schröder *et al.* 2007;

Saggu *et al.* 2009; Brecht *et al.* 2003). Zukünftige spektroskopische Studien müssten klären, ob ein  $\text{Ni}^{\text{I}}$ -Zustand tatsächlich Teil des katalytischen Zyklus ist. Nach Weiterleiten eines Elektrons auf die Fe-S-Cluster und des Protons auf das Glutamat würde wieder der  $\text{Ni}_a\text{-S}$  ausgebildet werden, der ein Wasserstoffmolekül abermals binden könnte (Abbildung 3I/J/C).

#### 4.6 Katalytische Eigenschaften der SH

Das Hydrogenase- und das Diaphorase-Modul wurden getrennt voneinander untersucht, um die katalytischen Reaktionen der Wasserstoffumwandlung am  $[\text{NiFe}]$ -Zentrum und der NAD(H)-Redoxreaktionen in HoxF unabhängig voneinander zu erforschen. Der gereinigte Diaphorase-Subkomplex katalysierte die Übertragung von Elektronen von NADH auf Benzylviologen und wies elektrokatalytische NADH-Oxidations- und  $\text{NAD}^+$ -Reduktions-Aktivität auf (Kapitel 3.4.3 und Kapitel 3.4.6). Dies erlaubte die Charakterisierung des Diaphorase-Moduls hinsichtlich der katalytischen Präferenz (Kapitel 3.4.7), der Fähigkeit in Gegenwart von  $\text{O}_2$  zu funktionieren (Kapitel 3.4.12), und der Produktion von ROS unter aeroben Bedingungen (Kapitel 3.4.5). Zur Interpretation dieser Ergebnisse sind die Daten der nativen SH und des Hydrogenase-Moduls hinzugezogen worden. Zudem wurde die physiologische Rolle des Enzyms und die Ähnlichkeit zu Komplex I berücksichtigt.

##### 4.6.1 NAD(P)(H)-Umwandlung des Diaphorase-Moduls

Das Diaphorase-Modul der SH katalysierte die reversible Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu NADH. Bislang ist keine Kristallstruktur für eine  $\text{NAD}^+$ -reduzierende Hydrogenase vorhanden, allerdings weist HoxFU eine hohe Ähnlichkeit zu der löslichen Domäne von Komplex I auf (Kapitel 3.6). Eine Kristallstruktur von Komplex I aus *T. thermophilus* zeigt, dass das mitkristallisierte NADH so zu FMN in der NAD(H)-Bindestelle orientiert ist, dass ein direkter Hydridtransfer von NADH auf FMN möglich ist (Berrisford und Sazanov 2009). Es ist aufgrund der Homologie des Diaphorase-Moduls zu Komplex I sehr wahrscheinlich, dass die Oxidation von NADH in der SH auch über einen direkten Hydridtransfer zum FMN verläuft. Elektronen müssten dann in Ein-Elektronenschritten von dem reduzierten FMN zu den  $[\text{FeS}]$ -Clustern oder zu künstlichen Elektronenakzeptoren übertragen werden. Das HoxF-Homologiemodell, das auf der Komplex I-Kristallstruktur aus *Thermus thermophilus* mit gebundenem NADH basiert (Abbildung 30), macht deutlich, dass die Bindung von NADH die Wechselwirkungen vermutlich beider Hydroxylgruppen der Riboseeinheit des Adenosins mit dem Aspartat 340 und Glutamat 341 umfasst (Sazanov und Hinchliffe 2006; Berrisford und Sazanov 2009). Im Falle von NADPH befindet sich eine zusätzliche Phosphatgruppe an der Position C2' des Riboseteils (Abbildung 30C, schwarzer Pfeil). Die Verbesserung der



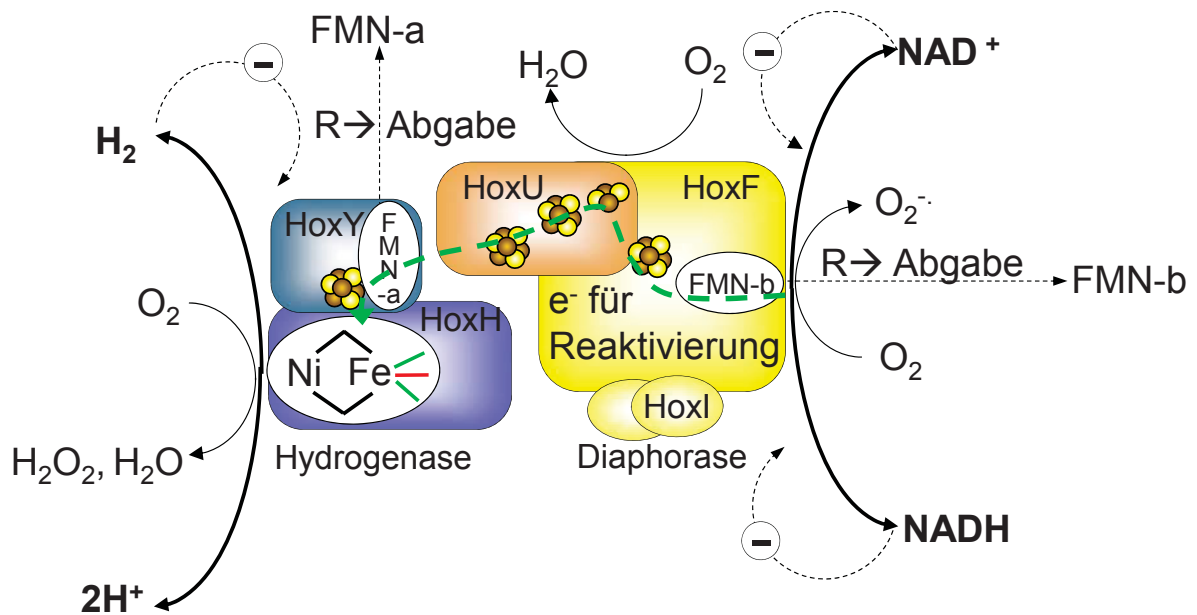
katalytischen Effizienz für die wasserstoffabhängige  $\text{NADP}^+$ -Reduktion durch die Aminosäuresubstitutionen D340A und E341A macht deutlich, dass die Bindung von  $\text{NADP}^+$  in der nativen SH wahrscheinlich durch sterische Hinderung und elektrostatische Abstoßung verhindert wird und  $\text{NADP(H)}$  somit ein schlechtes Substrat für die SH darstellt. Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse an Komplex I zeigten, dass das negative geladene Glutamat 183 (entspricht dem Aspartat 340 in HoxF) verantwortlich für die selektive  $\text{NADH}$ -Bindung in Komplex I ist (Morina *et al.* 2011). Nicht nur die in der Kristallstruktur des Komplex I für die Bindung von  $\text{NAD(H)}$ -involvierten Aminosäuren scheinen für die Selektivität von  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  wichtig zu sein, sondern auch Aminosäuren in der Umgebung. Daher wurden Aminosäuren in der Umgebung der  $\text{NAD(H)}$ -Bindestelle der SH ausgetauscht, so dass sie den Aminosäuren glichen, die in cyanobakteriellen bidirektionalen Hydrogenasen vorkommen. Die cyanobakteriellen bidirektionalen Hydrogenasen können sowohl  $\text{NADH}$  als  $\text{NADPH}$  als Reduktionsmittel benutzen (Schmitz *et al.* 2002; Aubert-Jousset *et al.* 2011). Die negativ geladenen Aspartatreste D401 und D467 wurden durch positiv geladenes Lysin bzw. polares Serin ersetzt. Die Aminosäureaustausche D401K und D467S verbesserten die  $\text{NADP}^+$ -Reduktionsaktivität der SH vermutlich als „Zugangsaminosäuren“ für  $\text{NADP}^+$  zur „Rossmann-Falte“ (Abbildung 30).

Während des Wachstums von *R. eutropha* mit  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$  und  $\text{O}_2$  katalysiert die SH die wasserstoffabhängige  $\text{NAD}^+$ -Reduktion. Der Hauptanteil des produzierten  $\text{NADH}$ s wird in der Atmungskette für den Aufbau eines Protonengradienten verwendet, der u. a. zur ATP-Synthese genutzt wird. Ein anderer Teil wird für die  $\text{CO}_2$ -Fixierung verwendet. Außerdem wird  $\text{NADH}$  durch Transhydrogenasen in  $\text{NADPH}$  umgewandelt, das für anabole Stoffwechselprozesse erforderlich ist (Cramm 2009). Es wurde gezeigt, dass die SH *in vivo* auch die reverse Richtung, d. h. die  $\text{NADH}$ -abhängige  $\text{H}^+$ -Reduktion katalysiert. Insbesondere eine kurzzeitige  $\text{NADH}$ -Oxidation könnte wichtig sein, um den  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -Pool auszubalancieren, wenn *R. eutropha* von aeroben zu anaeroben Wachstumsbedingungen wechselt (Kuhn *et al.* 1984). Analog dazu kann in Komplex I, bei dem die typische Funktion die  $\text{NADH}$ -Oxidation ist, der reverse Elektronenfluss ablaufen, um  $\text{NAD}^+$  zu reduzieren (Hirst 2010). Zusätzlich ist die Fähigkeit der SH, Elektronen von  $\text{NADH}$  zu dem aktiven  $[\text{NiFe}]$ -Zentrum des Hydrogenase-Moduls zu transferieren wichtig, um oxidierte, inaktive Zustände des  $[\text{NiFe}]$ -Zentrums zu reaktivieren. Das Diaphorase-Modul weist eine bidirektionale Aktivität auf, allerdings wird die  $\text{NAD}^+$ -Reduktion mit einer höheren Rate katalysiert als die  $\text{NADH}$ -Oxidation (Kapitel 3.4.7). Ebenso liegt die katalytische Präferenz der nativen SH auf Seiten der wasserstoffabhängigen  $\text{NADH}$ -Produktion (Schneider und

Schlegel 1976). Auch das Hydrogenase-Modul der SH ist in beide Richtungen aktiv. Es betreibt  $H^+$ -Reduktion und zeigt  $H_2$ -Oxidationsaktivität. Während die native SH und das Diaphorase-Modul die  $NAD^+$ -Reduktion bevorzugt katalysieren, zeigt das isolierte Hydrogenase-Modul eine leichte Präferenz für die Reduktion von Protonen. Da hier im Vergleich zur tetrameren SH jedoch beide Aktivitäten stark herabgesetzt sind, kann keine sichere Schlussfolgerung über die bevorzugte Katalyserichtung dieses Moduls getroffen werden. Im Gegensatz dazu zeigte das Diaphorase-Modul katalytische Aktivitäten, die mit denen der nativen SH vergleichbar sind.

#### 4.6.2 Regulationsmechanismen der SH-Aktivität

Die Aktivität der SH ist wie die meisten Enzyme im Metabolismus fein reguliert. Die stark unterschiedlichen Affinitätskonstanten für  $NADH$  und  $NAD^+$  im Zusammenspiel mit der Produkthemmung ( $NADH$  und  $NAD^+$ ) könnten als Regulationsmechanismen für die SH-Aktivität bei schwankendem  $NAD^+$  und  $NADH$ -Konzentrationen dienen. Ein aktuelles SH-Modell, das alle Reaktionen und Produktinhibitionen zusammenfasst, ist in Abbildung 40 dargestellt.



**Abb. 40: Aktuelles SH-Modell mit einzelnen Kofaktoren und katalysierten Reaktionen.** Die vermutlichen Quellen sowie die verschiedenen reduzierten Sauerstoffspezies sind dargestellt. Sauerstoff inaktiviert langsam das Hydrogenase-Modul, das aber schnell wieder reaktiviert werden kann. Die Elektronen des  $NADH$ , verantwortlich für eine schnelle Reaktivierung des oxidierten aktiven Zentrums, werden durch die FMN-Kofaktoren und  $[FeS]$ -Cluster transferiert (grüne gestrichelte Linie). Die  $CN^-$ -Liganden und der  $CO$ -Ligand des  $[NiFe]$ -Zentrums sind grün bzw. rot gekennzeichnet. Aus Gründen der Klarheit ist das Hydrogenase- vom Diaphorase-Modul separat gezeichnet. Die wichtigsten physiologischen Reaktionen sind in fetten Linien und Schrift gezeigt. „R“ steht für „unter reduzierenden Bedingungen“, „ $\Theta$ “ für „Produkt-Hemmung“. Für Details siehe Text und Referenzen (Schneider und Schlegel 1976; Albracht und Hedderich 2000; van der Linden *et al.* 2004; Burgdorf *et al.* 2005)

Für die NADH-Oxidation durch HoxFU betrug der  $K_M$ -Wert  $56 \mu\text{M}$  NADH, der in der gleichen Größenordnung wie der  $K_M$ -Wert von Komplex I aus Rinderherzmitochondrien ( $90 \mu\text{M}$ ) liegt (Gavrikova *et al.* 1995). Die Standardredoxpotentiale von  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  und von  $2\text{H}^+/\text{H}_2$  betragen  $-320\text{mV}$  bzw.  $-421 \text{ mV}$ . Wie im Folgenden beschrieben, führen die tatsächlichen Konzentrationsverhältnisse von  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  in der Zelle sogar zu höheren Potenzialen, die die NADH-abhängige  $\text{H}_2$ -Produktion verhindern. In *E.coli* liegt bei exponentiellem Wachstum mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen die NADH-Konzentration unter  $150 \mu\text{M}$  (Bennett *et al.* 2009). Unter der Annahme, dass das  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -Verhältnis unter aeroben Bedingungen in *R. eutropha* etwa 10:1 ist, wie es zuvor für *E. coli* ermittelt werden konnte, folgt nach der Nernst-Gleichung:  $E = E^\circ + 29,5 \text{ mV} \cdot \lg[\text{NAD}^+][\text{NADH}]^{-1}$ , ein Redoxpotential für das  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -Paar von  $E' = -290 \text{ mV}$ . Daher ist die NADH-abhängige  $\text{H}^+$ -Reduktion unter aeroben Bedingungen thermodynamisch ungünstig. Aufgrund der Produkt-Hemmung durch  $\text{NAD}^+$  ( $K_{\text{I}(\text{NAD}^+)} = 100 - 300 \mu\text{M}$ ) bei einer physiologisch relevanten Konzentration von ca.  $1 \text{ mM}$  ist die katalytische NADH-Oxidation durch die SH zusätzlich erschwert (Kapitel 3.4.11). Beide Faktoren stellen einen Kontrollmechanismus dar, um den Verlust von Reduktionskraft in Form von leicht entweichendem  $\text{H}_2$  zu vermeiden. Bei einem Wechsel von aeroben zu anaeroben Wachstumsbedingungen fehlt der terminale Elektronenakzeptor Sauerstoff, so dass die Konzentration von NADH steigt. Dadurch erniedrigt sich das Redoxpotential des  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -Paares (für eine Dekadenabnahme von  $[\text{NAD}^+][\text{NADH}]^{-1}$  um  $-29,5 \text{ mV}$ ). Bei einem  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -Verhältnis von 1:100 beträgt das Potential demnach  $-379 \text{ mV}$ . Ist die Wasserstoffkonzentration niedrig ( $100 \text{ nM H}_2$ , pH 8,0,  $E = -370\text{mV}$ ), so ist die NADH-abhängige Wasserstoffproduktion thermodynamisch möglich.

Die Protonenreduktion vieler membranständiger Hydrogenasen - wie z. B. die MBH aus *R. eutropha* - wird durch das Produkt Wasserstoff inhibiert.. Eine  $\text{H}^+$ -Reduktion unter einer  $\text{H}_2$ -Atmosphäre ist daher meist kaum nachweisbar (Vincent *et al.* 2005). Wie es für ein bidirektionales Enzym zu erwarten ist, war das Hydrogenase-Modul der SH allerdings auch in Gegenwart von  $100 \% \text{ H}_2$  noch aktiv (Kapitel 3.3.5). Dadurch kann die SH die Wasserstoffproduktion in ganzen Zellen beim Wechsel von aeroben zu anaeroben Bedingungen katalysieren, wie bereits von Kuhn *et al.* 1984 gezeigt wurde.

Sowohl die NADH-Oxidations- als auch die  $\text{NAD}^+$ -Reduktionsaktivität der SH sind durch kinetische Parameter reguliert. Während des Wachstums hält der kontinuierliche Verbrauch des von der SH produzierten NADH durch Komplex I, Transhydrogenasen oder der  $\text{CO}_2$ -Fixierung den  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  Pool relativ oxidiert, so dass die wasserstoffabhängige  $\text{NAD}^+$ -

Reduktion thermodynamisch bevorzugt ist (siehe oben). Das isolierte Diaphorase-Modul zeigte im Falle der  $\text{NAD}^+$ -Reduktion einen  $K_M$ -Wert von  $197 \mu\text{M}$  für  $\text{NAD}^+$  auf (Kapitel 3.4.10), was ca.  $2,5 \times$  niedriger ist als der  $K_M$ -Wert der nativen SH von  $500 \mu\text{M}$  (Schneider und Schlegel 1976). Allerdings sind beide Werte deutlich höher als der  $K_M$  ( $\text{NAD}^+$ ) von  $7 \mu\text{M}$  von Komplex I aus Rindermitochondrien (Gavrikova *et al.* 1995).

Wenn das Wachstum von *R. eutropha* von aeroben in anaerobe Bedingungen übergeht und der  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -Pool stärker reduziert vorliegt (Kuhn *et al.* 1984), steigt die Konzentration von  $\text{NADH}$ . Die relativ geringe Affinität der SH für  $\text{NAD}^+$  und die signifikante Produktinhibition der  $\text{NAD}^+$ -Reduktion durch  $\text{NADH}$  ( $K_{I(\text{NADH})}$  von ca. 200 bis  $300 \mu\text{M}$ ) würden neben thermodynamischen Gesichtspunkten die wasserstoffabhängige  $\text{NAD}^+$ -Reduktionsaktivität verlangsamen. Durch das Verhindern der wasserstoffabhängigen  $\text{NAD}^+$ -Reduktionsaktivität bei reduziertem  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -Pool wird daher die Rückreaktion, die  $\text{NADH}$ -abhängige Wasserstoffproduktion, unterstützt. Die kinetischen Parameter ( $K_M$ - und  $K_I$ -Werte) der SH unterstützen offensichtlich die thermodynamisch günstigere Reaktionsrichtung. Elektrochemische Experimente an HoxFU zeigten, dass sowohl die  $\text{NAD}^+$ -Reduktion als auch die  $\text{NADH}$ -Oxidation nahe dem Standardpotential des  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -Paares ablaufen (Kapitel 3.4.6). HoxFU arbeitet also ebenso wie das Hydrogenase-Modul in beide Katalyserichtungen mit nur minimalem Überpotential (Kapitel 3.3.5). Ein geringes Überpotential für die Wasserstoffumwandlung konnte kürzlich für die cyanobakterielle,  $\text{NAD(P)}^+$ -reduzierende Hydrogenase aus *Synechocystis sp.* PCC 6803 bestätigt werden (McIntosh *et al.* 2011). Beide Module der SH katalysieren elektrochemische Reaktionen, die bislang durch synthetische Katalysatoren nur träge und mit einem großen Überpotential verlaufen. Redoxenzyme, die ebenfalls nur geringe Überpotentiale aufweisen, sind die CO-Dehydrogenase, Komplex I, die Standardhydrogenasen und die Formiat-Dehydrogenase (Armstrong und Hirst 2011). Ein Überpotential von mehr als 80 mV für die  $\text{H}_2$ -Oxidation weisen jedoch die bislang untersuchten sauerstofftoleranten, membranständigen Hydrogenasen aus *R. eutropha*, *Aquifex aqueus* und *E. coli* auf (Vincent *et al.* 2005), (Pandelia *et al.* 2010), (Lukey *et al.* 2010). Daher demonstriert die Fähigkeit von HoxHY nahe dem  $E(2\text{H}^+/\text{H}_2)$  zu funktionieren, dass ein Überpotential für die  $\text{O}_2$ -Toleranz nicht unbedingt erforderlich ist. Ein nur minimales Überpotential ist besonders für die Funktion der SH wichtig, da sich  $E^\circ(2\text{H}^+/\text{H}_2) = -413 \text{ mV}$  nur um 100 mV von  $E^\circ(\text{NAD}^+/\text{NADH}) = -320 \text{ mV}$  unterscheidet und daher nur eine geringe treibende Kraft für die  $\text{H}_2$ - bzw.  $\text{NADH}$ -Oxidation zur Verfügung steht.

#### 4.6.3 Potential-abhängige Effekte auf die Aktivität der SH

In der NAD(H)-Bindestelle der SH spielt das FMN-b für die Zwei-zu-Ein-Elektronen-Konversion und die Weiterleitung auf die [FeS]-Cluster in eine wichtige Rolle. Hirst und Mitarbeiter (2007) untersuchten einen Subkomplex von Komplex I aus bovinen Mitochondrien, der Ähnlichkeiten zu HoxF aus *R. eutropha* besitzt. Bei Potentialen unterhalb von -400 mV unterlag der Subkomplex einer reversiblen reduktiven Inaktivierung (Barker *et al.* 2007). Um die Inaktivierung zu erklären, wurden zwei Modelle aufgestellt. Zum einen wurde ein Modell vorgeschlagen, bei dem die semireduzierte Form des Flavins die Aktivität des Komplex I verstärkt und zum anderen eines, das die Auswirkungen des Redoxzustandes des in der Nähe befindlichen [2Fe-2S]-Clusters in der „24 kDa-Untereinheit“ (analog zu Nqo2) berücksichtigt. Für beide Modelle wurden Voltammogramme simuliert, die beide im Einklang mit den experimentellen Daten standen. Es wurde vorgeschlagen, dass die Inaktivierung bei niedrigen Potentialen eine physiologische Rolle bei der Verlangsamung des rückläufigen Elektronentransports (Ubiquinol zu  $\text{NAD}^+$ ) spielen könnte (Barker *et al.* 2007). Für das HoxFU-Modul der SH konnte bei  $\text{NAD}^+$ -Konzentrationen oberhalb des  $K_M$  für  $\text{NAD}^+$  in einem Potentialbereich -0,1 V bis -0,6 V keine plötzliche Inaktivierung festgestellt werden (Kapitel 3.4.9). In HoxFU fehlt ein Pendant zum [2Fe2S]-Cluster der „24 kDa-Untereinheit“ von Komplex I, was vermuten lässt, dass dieser in der reversiblen Inaktivierung von Komplex I involviert sein könnte. Bei negativen Potentialen wurde allerdings ein langsamer Verlust von HoxFU-Aktivität bei  $\text{NAD}^+$ -Konzentrationen beobachtet, die deutlich unter dem  $K_M(\text{NAD}^+)$ -Wert lagen. Es gab keine Anzeichen für eine Reaktivierung, wenn das Elektrodenpotential wieder zu positiveren Werten verschoben wurde, was wahrscheinlich auf eine irreversible Schädigung des Proteins zurückzuführen ist. Außerdem verschob sich der Beginn der katalytischen  $\text{NAD}^+$ -Reduktion zu negativeren Potentialen. Beide Sachverhalte legen nahe, dass die verbleibende Aktivität mit einer geschädigten Fraktion des Enzyms verbunden ist. Es wurde bereits beschrieben, dass reduzierende Bedingungen zu dem Verlust des FMN-a in der SH oder des entsprechenden Flavins in Komplex I führen, insbesondere in der Abwesenheit von  $\text{NAD}^+$  (van der Linden *et al.* 2004), (Sled und Vinogradov 1993). Ebenso erforderten die simulierten Voltammogramme des Komplex I (siehe oben) die Berücksichtigung des FMN-Verlustes aus dem Enzym und die Inaktivierung bei niedrigen Potentialen (Barker *et al.* 2007). Für Komplex I konnte das Redoxpotential für FMN mit ca. -400mV (pH 8,0) durch Auftauchen von nichtkatalytischen Strömen in Abwesenheit von Substrat bestimmt werden. Das Potential für FMN in HoxFU konnte leider nicht bestimmt werden, da keine nichtkatalytischen Signale zu detektieren waren. Wahrscheinlich liegt das



Redoxpotential des FMN-b wie in Komplex I bei etwa -400 mV. Bei diesem Redoxpotential konnte eine Inaktivierung der HoxFU-Aktivität bei gleichzeitiger niedriger Substratkonzentration beobachtet werden. Bei  $\text{NAD}^+$ -Konzentrationen deutlich unter dem  $K_M$  ( $\text{NAD}^+$ ) liegt die NAD(H)-Bindestelle wahrscheinlich längere Zeit unbesetzt vor. Wenn nun ein geringes Potential ( $\sim -400$  mV) eingestellt wird, wird das FMN-b reduziert und kann wie in Komplex I leicht aus dem Enzym verloren gehen, da die Dissoziationskonstante von reduziertem FMN 60000-mal geringer ist als für oxidiertes FMN (Barker *et al.* 2007). Bei Experimenten mit HoxFU in Lösung führten hohe NADH-Konzentrationen (1 mM) ebenfalls zum Verlust der NADH-abhängigen BV-Reduktionsaktivität und einer Freisetzung von FMN (Kapitel 3.4.4). Dies kann durch das niedrige Redoxpotential einer reinen NADH-Lösung ( $E = -408,5$  mV bei  $[\text{NAD}^+][\text{NADH}]^{-1} = 0,001$ ) erklärt werden. Weitere Arbeiten, in denen die Redoxpotentiale der Redoxzentren in HoxFU mit EPR-Redox titrationen bestimmt werden, wären notwendig, um das Zusammenspiel des FMN mit den [Fe-S]-Clustern besser zu verstehen. Dafür wäre jedoch ein besseres Produktionssystem nötig, um HoxFU in Milligramm-Mengen zu reinigen.

#### 4.6.4 HoxFU produziert Superoxid

Reaktive Sauerstoffspezies wie Superoxid oder Wasserstoffperoxid gelten als Hauptquelle von oxidativem Stress in Zellen. In Komplex I wurden reduziertes Flavin und der [4Fe4S]-Cluster in Nqo6 als Orte der Superoxid-Produktion vorgeschlagen. Die Superoxidproduktion erhöhte sich, wenn der  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -Pool reduziert vorlag (Kusmaul und Hirst 2006; Berrisford *et al.* 2008; Hirst 2010). Im Falle der SH wird FMN-b vermutlich durch direkten Hydridtransfer vom Substrat NADH reduziert. Die Ein-Elektronenübertragung zu den [FeS]-Clustern führt zu den Semichinonradikalformen des Flavins, die auch bei der Reduktion des FMN-b in HoxFU durch Dithionit zu beobachten war (Kapitel 3.4.4). In Anwesenheit von NADH und  $\text{O}_2$  weist HoxFU eine Superoxid-Umsatzrate von  $0,46 \text{ min}^{-1}$  auf, die vergleichbar ist mit der entsprechenden Rate für das SH-Holoenzym ( $0,31 \text{ min}^{-1}$ ) (Kapitel 3.5.5). Daher kann HoxFU als Hauptort der Superoxidproduktion in der SH angesehen werden. Die Superoxidproduktion der SH liegt in derselben Größenordnung wie die der Glutathion-Reduktase ( $0,8 \text{ min}^{-1}$ ), aber geringer im Vergleich zur Succinat-Dehydrogenase ( $13 \text{ min}^{-1}$ ), zu Komplex I aus *Bos taurus* ( $40 \text{ min}^{-1}$ ) und der Fumarat-Reduktase ( $1.600 \text{ min}^{-1}$ ) (Kusmaul und Hirst 2006; Imlay 1995). Für Komplex I aus *Bos taurus* wurde vornehmlich die Bildung von Superoxid gezeigt, jedoch kein Wasserstoffperoxid (Kusmaul und Hirst 2006). Im Gegensatz zum Komplex I aus *Bos taurus*, produziert Komplex I aus *E. coli* hauptsächlich Wasserstoffperoxid (Esterhazy *et al.* 2008). Es wurde vorgeschlagen, dass der [2Fe2S]-



Cluster in der „24 kDa-Untereinheit“ die Lebensdauer des reduzierten Flavins durch vorübergehende Aufnahme eines Elektrons minimieren kann (Esterhazy *et al.* 2008). Das Fehlen eines analogen Clusters in HoxFU und die geringere Rate der Produktion von Superoxid als in Komplex I unterstützt diese Hypothese jedoch nicht.

#### 4.6.5 Weitere Reaktionen des Diaphorase-Moduls mit Sauerstoff

Die SH katalysiert *in vivo* die  $H_2$ -vermittelte  $NAD^+$ -Reduktion auch in der Anwesenheit von  $O_2$  (Schneider und Schlegel 1976). Dabei stellt sich die Frage, welche molekularen Mechanismen in der SH für die Sauerstofftoleranz verantwortlich sind. Elektrochemische Experimente am isolierten HoxFU zeigten, dass beide Katalyserichtungen, d. h. die  $NAD^+$ -Reduktion sowie die NADH-Oxidation auch in Gegenwart von  $O_2$  ablaufen. Im Verlaufe der NAD(H)-Umwandlung wurden jedoch einige Elektronen für die Reduktion von Sauerstoff genutzt, wobei Superoxid und Wasser freigesetzt wurden. Allerdings waren die Superoxid- und Wasserproduktionsraten 6500- bzw. 509-fach geringer als die NADH-Umsatzrate. Die Superoxidproduktion findet dabei wahrscheinlich am FMN-b statt (siehe Kapitel 3.5.5), wohingegen Ort und Mechanismus der Wasserproduktion unklar sind.

Ähnlich wie Komplex I enthält HoxFU ein Flavin und mehrere [Fe-S]-Cluster. Die Wasserproduktion als Folge der  $O_2$ -Reduktion wurde für den isolierten Komplex I bislang nicht gezeigt. Für HoxFU wären zwei Elektronen vom reduzierten FMN-b und zwei weitere Elektronen von [Fe-S]-Clustern ausreichend, um  $O_2$  vollständig zu Wasser zu reduzieren. Von Flavin-abhängige Monooxygenasen ist es z.B. bekannt, dass sie die  $O=O$  Bindung über das Flavin spalten, ein Sauerstoffatom auf das Substrat übertragen und das andere Sauerstoffatom zu Wasser reduzieren (Massey 1994). Eine andere Möglichkeit wäre Wasserproduktion an einem Metallcluster, der als Folge der Ablösung von HoxHY vom HoxFU-Modul der umgebenden Lösung ausgesetzt ist. Aufgrund der räumlichen Anordnung der Fe-S-Cluster, wäre der wahrscheinlichste Kandidat der distale [4Fe-4S]-Cluster in HoxU, der dem Cluster N5 in Komplex I entspricht (Albracht und Hedderich 2000; Sazanov und Hinchliffe 2006). Es ist wichtig zu erwähnen, dass kein Eisen-Schwefel-Cluster bekannt ist, der die Reduktion von  $O_2$  zu  $H_2O$  katalysieren kann.

Allerdings sind Metallkofaktoren nicht unbedingt für die NADH-abhängige Produktion von  $H_2O$  über  $O_2$  erforderlich. In der  $H_2O$ -bildenden NAD(P)H-Oxidase aus *Lactobacillus sanfranciscensis* wird das im Enzym gebundene FAD durch eine Hydridübertragung von NAD(P)H reduziert (Lountos *et al.* 2006). Anschließend wird  $O_2$  zu  $H_2O$  reduziert, wobei zunächst ein Wasser-Molekül freigesetzt wird, während das verbleibende Sauerstoffatom an einen konservierten Cysteinrest gebunden wird, so dass Cys-SOH als Zwischenprodukt

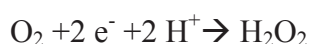
entsteht. Mit Hilfe eines zweiten NAD(P)H-Moleküls wird das Cys-SOH-Derivat wieder zu einem Thiolat reduziert und ein zweites H<sub>2</sub>O-Molekül freigesetzt. In dem aerotoleranten Anaerobier *L. sanfranciscensis* wird über diesen Mechanismus Sauerstoff „entsorgt“ und so oxidativer Stress vermieden. Außerdem kann durch die NADH-Oxidase NAD<sup>+</sup> für die Glykolyse regeneriert werden. Die NADH-Peroxidase aus *Enterococcus faecalis* scheint über einen vergleichbaren Mechanismus mit einem redoxaktiven Cystein Wasserstoffperoxid zu Wasser zu reduzieren (Poole und Claiborne 1989). Es ist denkbar, dass in HoxFU ein ähnlicher Mechanismus für die H<sub>2</sub>O-Produktion über den FMN-b-Kofaktor verantwortlich ist. Jedoch kommt in der kombinierten FMN/NAD(H)-Bindetasche der SH kein Cystein vor (Abbildung 30), das als H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Akzeptor von dienen könnte. Daher bleiben Ort und Mechanismus der H<sub>2</sub>O-Freisetzung durch HoxFU unbekannt.

#### 4.6.6 Reaktionen des Hydrogenase-Moduls mit Sauerstoff

Im Gegensatz zum Diaphorase-Modul wird das Hydrogenase-Modul langsam durch O<sub>2</sub> inaktiviert. Die Sauerstoffinaktivierung von HoxHY (ca. 0,02 s<sup>-1</sup> bei 30 °C, +216 mV und 2 % O<sub>2</sub>) erfolgt deutlich langsamer als bei der [NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio desulfuricans* (ca. 0,8 s<sup>-1</sup> unter ähnlichen Bedingungen; Liebgott *et al.* 2010). Von der Hydrogenase aus *D. fructosovorans* existieren O<sub>2</sub>-tolerante Varianten mit verändertem Gaskanal, die allerdings immer noch fünfmal schneller durch Sauerstoff inaktiviert wurden als das HoxHY-Modul (0,1 s<sup>-1</sup> für die V74Q-Variante; Liebgott *et al.* 2010). Die Sauerstoffinaktivierungsrate ist ebenfalls geringer als die der meisten [FeFe]-Hydrogenasen, jedoch ähnlich der der Hydrogenase aus *Clamydomonas reinhardtii* (Liebgott *et al.* 2010), (Goldet *et al.* 2009). Die O<sub>2</sub>-tolerante, membrangebundene [NiFe]-Hydrogenase aus *Aquifex aeolicus* reagiert ebenfalls nur langsam mit O<sub>2</sub> (Pandelia *et al.* 2010). Daher stellt sich die Frage, wie die Sauerstofftoleranz der SH vermittelt wird, wenn das [NiFe]-Zentrum durch O<sub>2</sub> langsam inaktiviert wird. Die elektrochemischen Studien zeigten, dass HoxHY eine Halbwertszeit von etwa 1 min bei 10 °C, +216 mV und 2 % O<sub>2</sub> aufwies, allerdings wurde die Aktivität bei niedrigeren Potentialen schnell wiederhergestellt (vollständig innerhalb von 10 s bei -384 mV). Die Reaktivierung fand sogar in Gegenwart von O<sub>2</sub> statt (Kapitel 3.3.9). Das Reaktivierungspotential von  $E_{\text{switch}} = -170$  mV für HoxHY-Spezies, die zuvor durch Sauerstoff inaktiviert wurden, weist darauf hin, dass die Reaktivierung der nativen SH durch das Redoxpotential des cytoplasmatischen NAD<sup>+</sup>/NADH-Pools (ca.  $E = -290$  mV) gewährleistet sein sollte. Demzufolge ist die kontinuierliche aerobe H<sub>2</sub>-Oxidation bei Potentialen nahe  $E(2\text{H}^+/\text{H}_2)$  möglich.

Das isolierte Hydrogenase-Modul war zunächst inaktiv und benötigte eine Reaktivierung (Kapitel 3.3.2 und Kapitel 3.3.6). Es konnte in Lösung entweder durch Dithionit oder immobilisiert auf einer Elektrode durch ein geringes Potential reaktiviert werden. Vergleichbar dazu ist für die gereinigte native SH eine „autokatalytische“ Reaktivierung durch NADH notwendig (Schneider *et al.* 1976).

Das gereinigte HoxHY-Modul wies bei pH-Werten von pH 8,0, 7,0 und bzw. 6,0  $E_{\text{switch}}$ -Werte von -340 mV, -300 mV bzw. -245 mV auf. Dies deutet darauf hin, dass die reduktive Reaktivierung mit einem Protonen-Transfer einher geht. Nach Reduktion einer Sauerstoffspezies im aktiven Zentrum und Protonenübertragung im HoxHY-Modul könnte z. B. Wasserstoffperoxid oder Wasser freigesetzt werden, siehe Schema 1.



Schema 1: Produzierte Sauerstoffspezies nach Reduktion von Sauerstoff

Außerdem wurde nach erneuter Sauerstoffinaktivierung des zuvor reaktivierten HoxHY-Proteins ein zweites Reaktivierungspotential ( $E_{\text{switch}} = -170$  mV bei pH 7,0) festgestellt, das höher war als das Reaktivierungspotential des frisch isolierten HoxHY-Proteins ( $E_{\text{switch}} = -300$  mV bei pH 7,0). Dies deutet auf zwei unterschiedliche durch Sauerstoff inaktivierte Spezies hin. Der erste  $E_{\text{switch}}$ -Wert von -300mV steht in guter Übereinstimmung mit dem Redoxpotential des zu 10 bis 20 % reduzierten  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -Pools in *E. coli*-Zellen, das auch in *R. eutropha* zu erwarten ist. Das zweite Reaktivierungspotential ( $E_{\text{switch}} = -170$  mV) stimmt mit dem Redoxpotential des SH-Kofaktors FMN-a (-170 mV) überein (Erkens *et al.* 1996; Bennett *et al.* 2009), (van der Linden *et al.* 2006). Für die bidirektionale Hydrogenase aus *Synechocystis sp.* PCC 6803 wurden ebenfalls zwei unterschiedliche Reaktivierungspotentiale (-372 mV und ca. -100mV) detektiert (McIntosh *et al.* 2011). Die oxidativ inaktivierte MBH aus *R. eutropha* weist mit +115 mV bei pH 6,0 einen sehr viel positiveren  $E_{\text{switch}}$ -Wert auf (Vincent *et al.* 2005) als das inaktive HoxHY-Modul, das zwei verschiedene Reaktivierungspotentiale besitzt ( $E_{\text{switch}} = -245$  mV bei pH 6,0, zweiter  $E_{\text{switch}} = -170$  mV bei pH 7,0). Dies kann mit der Kopplung der MBH mit dem Chinon-Pool in der cytoplasmatischen Membran erklärt werden, dessen Potential bei etwa +90 mV liegt (Bernhard *et al.* 1997). Auch die  $E_{\text{switch}}$ -Werte der beiden membranständigen Hydrogenasen, Hyd-1 und Hyd-2, aus *E. coli* sind mit +150 bzw. -85 mV (pH 6,0) deutlich positiver (Lukey *et al.* 2010) als die von HoxHY.

Das Hydrogenase-Modul ist in der nativen SH über eine Elektronentransportkette mit dem Diaphorase-Modul verbunden, so dass die Wasserstoffoxidation direkt an die  $\text{NAD}^+$ -Reduktion gekoppelt ist. Falls das  $[\text{NiFe}]$ -Zentrum durch Sauerstoff oxidiert wird, können demzufolge Elektronen aus NADH durch reversen Elektronentransfer das  $[\text{NiFe}]$ -Zentrum reaktivieren. Die in der CV beobachteten hohen  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ - und  $2\text{H}^+/\text{H}_2$ -Umsatzraten über einen weiten Potentialbereich bei nur minimalem Überpotential erlaubten sowohl Wasserstoffoxidation als auch Wasserstoffproduktion unter physiologischen Bedingungen. Dadurch kann *R. eutropha* mit Wasserstoff als Energiequelle wachsen und bei einem Wechsel von aeroben zu anaeroben Wachstumsbedingungen überschüssige Reduktionsequivalente in Form von Wasserstoff entsorgen.

#### 4.7 Durch Sauerstoff hervorgerufene Redoxzustände in der SH

Von welcher Natur sind die Sauerstoffmodifikationen des  $[\text{NiFe}]$ -Zentrums der SH? Die spektroskopischen Untersuchungen an der isolierten nativen SH und dem Hydrogenase-Modul deckten oxidierte, inaktive Redoxzustände auf, die jedoch schnell reaktiviert werden können (Kapitel 3.2 und Kapitel 3.3). Im Gegensatz zu den  $\text{O}_2$ -sensitiven Standard-Hydrogenasen trat jedoch kein inaktiver, nur langsam reaktivierbarer  $\text{Ni}_\text{a}$ -A-Zustand auf (Fernandez *et al.* 1985;

Kurkin *et al.* 2004). Die Reaktivierung der SH ist ein schneller Prozess, der sogar in Gegenwart von Sauerstoff stattfinden kann (siehe Kapitel 3.3.9). Die FTIR-Analyse des HoxHY-Subkomplexes zeigte zwei oxidierte Zustände ( $\text{Ni-Ox}$  und  $\text{Ni-Ox}_2$ ), die bei der *in situ*-Spektroskopie der nativen SH nicht gefunden wurden. IR-Daten vom HoxHY-Subkomplex der bidirektionalen Hydrogenase aus dem Schwefelpupurbakterium *Allochromatium vinosum* deckten ebenfalls eine Mischung von Redoxzuständen auf (Long *et al.* 2007), die auch bei der SH und der bidirektionalen Hydrogenase aus *Synechocystis* detektiert wurden. Der am stärksten oxidierte Zustand des HoxHY-Moduls ist  $\text{Ni-Ox}$ , der zu dem ebenso inaktiven  $\text{Ni-Ox}_2$  umgewandelt werden kann. Das frisch isolierte Hydrogenase-Modul, das für die elektrochemischen Experimente eingesetzt wurde (Kapitel 3.3.6), befand sich vorwiegend im  $\text{Ni-Ox}$ -Zustand (Kapitel 3.3.10). Daher ist der niedrige  $E_{\text{switch}}$ -Wert von -300 mV des gereinigten Hydrogenase-Moduls wahrscheinlich auf die Umwandlung des  $\text{Ni-Ox}$ -Zustandes in die verschiedenen reduzierten  $\text{Ni}_\text{a}$ -SR-Zustände zurückzuführen. Ein zweites Reaktivierungsspotential bei -170 mV wurde nach der  $\text{O}_2$ -Exposition des aktiven Enzyms festgestellt. Es ist jedoch nicht klar, wie dieser Reaktivierungsschritt mit den spektroskopisch beobachteten Zuständen in Verbindung steht. Weitere spektroelektrochemische Untersuchungen sind erforderlich, um die Reaktivierung des  $[\text{NiFe}]$ -Zentrums von HoxHY zu

verstehen. Für das Hydrogenase-Modul konnte durch elektrochemische Untersuchungen gezeigt werden, dass keine anaerobe oxidative Inaktivierung bei hohem Redoxpotential stattfand (Kapitel 3.3.6). Dies ist in Übereinstimmung mit der elektrochemischen Charakterisierung der bidirektionalen Hydrogenase aus *Synechocystis sp.* PCC 6803 (McIntosh *et al.* 2011). Eine reversible Inaktivierung bei hohem Redoxpotential unter anaeroben Bedingungen ist typisch für die Ausbildung des Ni<sub>I</sub>-B-Zustandes mit einer Hydroxylgruppe als Brückenligand zwischen Nickel und Eisen im aktiven Zentrum der membranständigen Hydrogenasen (Vincent *et al.* 2007). Das deutet darauf hin, dass sich die oxidierten Zustände der SH von den oxidierten Redoxzuständen der membranständigen Hydrogenasen unterscheiden.

Die SH zeigt im gereinigten, oxidierten Zustand ein außergewöhnliches IR-Spektrum mit vier CN<sup>-</sup>- und einem CO-Liganden. Die damalige Interpretation war, dass zwei zusätzliche CN<sup>-</sup>-Liganden am [NiFe]-Zentrum vorhanden sind (van der Linden *et al.* 2004). In der vorliegenden Studie konnte diese Hypothese jedoch widerlegt werden (Kapitel 3.1). Es stellt sich allerdings die Frage, wie dieses Bandenmuster zustande kommt. Zusammen mit Marius Horch wurde die Hypothese aufgestellt, dass die isolierte SH reversible Sauerstoffmodifikationen an den verbrückenden Cysteinen des [NiFe]-Zentrums trägt, die leicht durch Reduktion mit NADH entfernt werden können. Die Simulation der CN<sup>-</sup>- und CO-Streckschwingungen, bei denen jeweils eines der verbrückenden Cysteine eine Sauerstoffmodifikation besitzt, führte zu Spektren, die dem komplexen Bandenmuster der gereinigten SH sehr ähnlich sind (persönliche Mitteilung Marius Horch). Die einfachste Erklärung des außergewöhnlichen IR-Spektrums der isolierten ist eine Überlagerung verschiedener Redoxzustände, die alle dieselben CO-Streckschwingungen besitzen.

Nach Behandlung der isolierten SH mit vier CN<sup>-</sup>-Banden mit dem Reduktionsmittel DTT halbierte sich die Anzahl der CN<sup>-</sup>-Banden und es entstand ein IR-Spektrum, welches dem Ni<sub>I</sub>-B-ähnlichen Zustand zugeordnet werden konnte (Kapitel 3.2.6). Ein Ni<sub>I</sub>-B-ähnlicher Zustand konnte auch für die bidirektionale Hydrogenase aus *Synechocystis sp.* PCC 6803 detektiert werden (Germer *et al.* 2009). Reduktionsmittel wie DTT, Mercaptoethanol oder TCEP sind dafür bekannt, Disulfidbrücken oxidiertester Cysteine zu reduzieren sowie Enzyminaktivierung, die durch Oxidation von Thiol-Gruppen hervorgerufen wird, zu verhindern (Luo *et al.* 2012; Seefeldt *et al.* 2012). Außerdem verdoppeln Reduktionsmittel wie DTT oder TCEP die H<sub>2</sub>:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktaseaktivität der SH. Ein ähnlicher Effekt wurde mit FMN erzielt, was auf einen ähnlichen Reaktionsmechanismus hinweist. Daher ist es wahrscheinlich, dass die genannten Reduktionsmittel durch einen bislang unbekannten

Mechanismus die Entfernung oxidativer Modifikationen des aktiven Zentrums der SH erlauben. Frühere XAS-Studien deckten auf, dass das Nickel der gereinigten SH im Gegensatz eine im Vergleich zu anderen [NiFe]-Hydrogenasen auffällige N/O-Koordination aufweist (Gu *et al.* 1996; Müller *et al.* 1997; Burgdorf *et al.* 2005). Nach Reduktion der SH mit NADH und H<sub>2</sub> zeigte sich eine signifikante strukturelle Änderung, wobei das Nickel hauptsächlich S-Liganden aufwies, was auf die reversible Entfernung von Sauerstoffspezies (oder Stickstoff) hinweist. Die Reversibilität der Sauerstoff-Modifikation von Nickel-Thiolaten in NiN<sub>2</sub>S<sub>2</sub>-Modellkomplexen konnte schon von Darensbourg und Mitarbeitern gezeigt werden und deutet auf die generelle Möglichkeit der reversiblen Reduktion von S=O Spezies an Nickel hin (Farmer *et al.* 1994; Darensbourg und Grapperhaus 1998).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die oxidierte SH höchstwahrscheinlich Sauerstoffmodifikationen an den koordinierenden Cysteinen trägt (Abbildung 41B). Diese können durch ein geringes Potential, wie es durch NADH physiologisch erreicht wird, wieder reduziert werden.

#### 4.8 Modell der Sauerstofftoleranz der SH

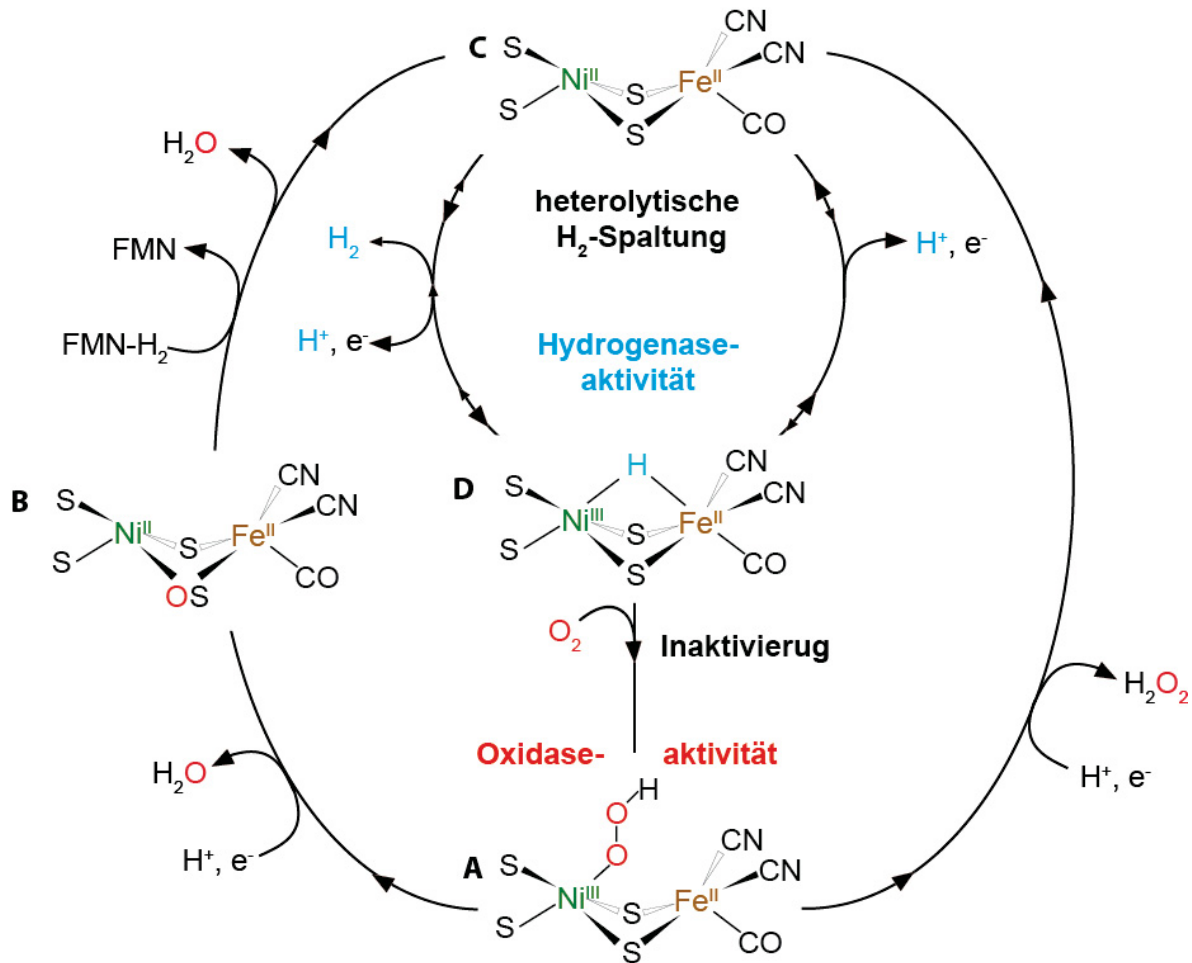
Die SH ist in der Lage in Gegenwart von Sauerstoff, Wasserstoff zu oxidieren. Bei einer O<sub>2</sub>-Konzentration von 0,47 mM (40% Sättigung), verringerte sich die Aktivität von 480 s<sup>-1</sup> nur um 15 % auf 408 s<sup>-1</sup>. Unter den gleichen Bedingungen wurde eine O<sub>2</sub>-Reduktionsaktivität von 1,8 s<sup>-1</sup> bestimmt. Dies zeigt, dass die SH kontinuierlich sowohl mit H<sub>2</sub> als auch O<sub>2</sub> reagiert. Somit erfolgt bei der Oxidation von etwa 200 H<sub>2</sub>-Molekülen die Reduktion eines O<sub>2</sub>-Moleküls.

Es ist wichtig anzumerken, dass die NADH-abhängige O<sub>2</sub>-Reduktionrate (1,6 s<sup>-1</sup>) der SH 15-fach höher war als die H<sub>2</sub>-Freisetzung über die NADH-abhängige Protonenreduktion (0,11 s<sup>-1</sup>). Dies ist in Übereinstimmung mit dem Modell, bei dem H<sup>+</sup> und O<sub>2</sub> am [NiFe]-Zentrum um die Elektronen konkurrieren (Abbildung 41). Aus thermodynamischen Gründen wird O<sub>2</sub> deutlich bevorzugt. Zuvor wurde gezeigt, dass die SH als H<sub>2</sub>-produzierendes Redox-Ventil in *R.eutropha*-Zellen dient, die von aeroben zu anaeroben Wachstumsbedingungen wechseln (Kuhn *et al.* 1984).

Hydrogenasen, die mit dem Photosystem gekoppelt sind, stellen ein vielversprechendes System zur lichtgetriebenen H<sub>2</sub>-Produktion dar. Die SH weist eine hohe Sauerstofftoleranz auf, die für eine Verknüpfung mit der oxygenen Photosynthese notwendig ist, bei der Sauerstoff freigesetzt wird (siehe Abbildung 42GI und GII für zwei verschiedene Ansätze für die Kopplung mit dem Photosystem). Allerdings weist die SH nur eine sehr geringe anaerobe



NADH-vermittelte  $\text{H}_2$ -Produktionsaktivität ( $0,11 \text{ s}^{-1}$ ) auf. Außerdem ist die  $\text{O}_2$ -Reduktionsrate in Gegenwart von 40%  $\text{O}_2$  15-mal höher als die  $\text{H}_2$ -Produktionsrate.



**Abb. 41: Reduktion von  $\text{O}_2$  am aktiven  $[\text{NiFe}]$ -Zentrum der SH.** Während der  $\text{H}_2$ -Umwandlung wird das  $\text{Ni}_a\text{-C}$ -Intermediat gebildet. In Anwesenheit von  $\text{O}_2$  unterliegt die aktive SH aerober Inaktivierung. Vermutlich wird ein Peroxid-Ligand gebildet, der schnell durch die Freisetzung von Wasserstoffperoxid reaktiviert werden kann. Ferner ermöglicht eine FMN-abhängige Reaktion die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser über ein Cys-SO-Intermediat. Allerdings ist es fraglich, welches der vier koordinierenden Cysteine die Sauerstoffmodifikation trägt.

Die meisten Reduktionsäquivalente werden für die  $\text{O}_2$ -Reduktion genutzt und stehen deshalb nicht für die Reduktion von Protonen zu  $\text{H}_2$  zur Verfügung. Daher ist die SH kein geeignetes Enzym für den Einsatz in der lichtgetriebenen  $\text{H}_2$ -Produktion.

Es stellt sich die Frage, wie die Reduktion der oxidierten Cysteine in der SH katalysiert wird. Für sauerstofftolerante, membranständige Hydrogenasen wurde die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser am katalytischen Zentrum über einen reversen Elektronentransport postuliert (Cracknell *et al.* 2009). Es wurde weiterhin vorgeschlagen, dass Wasser über einen Wasserkanal vom aktivem Zentrum zur Proteinoberfläche gelangt, wie es für die MBH als auch für Laccasen und Cytochrom-*c*-Oxidasen gezeigt wurde (Bento *et al.* 2005; Fritsch *et al.*

2011; Tiefenbrunn *et al.* 2011). Die vorliegende Studie bringt den ersten experimentellen Beweis für die Hypothese der Wasserproduktion. Die native SH reduzierte mit Hilfe von Wasserstoff Sauerstoff zu Superoxid, Wasserstoffperoxid und Wasser (Kapitel 3.5). Allerdings wurden bei der NADH-abhängigen O<sub>2</sub>-Reduktion nur 68-82% der Sauerstoffatome als Reduktionsprodukte detektiert. Das geringe Sauerstoffatom-Ungleichgewicht wurde wahrscheinlich durch gewisse Ungenauigkeiten der komplexen Messsysteme verursacht. Superoxidproduktion wurde, wie in Kapitel 3.5.5 beschrieben, dem FMN-b zugeordnet. Die Wasserstoffperoxid-Produktion der nativen SH war etwa 50-mal höher als die Superoxidproduktionsrate. Dabei zeigte das Diaphorase-Modul nur eine sehr geringe H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktionsrate, die auf den spontanen Zerfall des produzierten Superoxids zurückzuführen ist. Dies deutet darauf hin, dass das Hydrogenase-Modul die Hauptquelle der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion ist (Kapitel 3.5.6). Die NADH-abhängige Wasserstoffperoxidproduktion durch die Wildtyp-SH und das SH<sup>I64A</sup>-Derivat zeigt, dass der rückläufige Elektronenfluss von der NADH-Bindungsstelle im Diaphorase-Modul zu entweder dem [NiFe]-Zentrum, dem FMN-a oder dem [4Fe-4S]-Cluster im Hydrogenase-Modul eine wichtige Rolle in der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Freisetzung spielt. Bislang wurde kein herkömmlicher Eisen-Schwefel-Cluster als Quelle von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> identifiziert, während FMN ein bekannter Kofaktor für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion ist (Massey 1994). Tatsächlich war die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion des SH<sup>wt</sup>-Enzyms deutlich von der Anwesenheit von FMN in dem Reaktionsansatz abhängig, jedoch anders als erwartet. Bisherigere Studien zeigten, dass FMN-a nur lose an das Enzym gebunden ist und die SH mit geringem FMN-a-Gehalt durch Zusatz von externem FMN rekonstituiert werden kann (Schneider und Schlegel 1978; van der Linden *et al.* 2004). Das SH<sup>wt</sup>-Enzym mit geringem FMN-a-Gehalt zeigte eine zweifach höhere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktionsrate als SH-Protein in Gegenwart von extern appliziertem FMN. Unter Annahme, dass das externe FMN in die FMN-a-Bindetasche der SH eingebaut wird, deutet dies darauf hin, dass Wasserstoffperoxid am [NiFe]-Zentrum statt am FMN-a erzeugt wird (Abbildung 41A zu C, rechts). Die SH ist erstaunlich stabil in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, solange sie keine H<sub>2</sub>-Katalyse betreibt. Nach 24-stündiger Inkubation mit 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verringerte sich die wasserstoffabhängige NAD<sup>+</sup>-Reduktionsaktivität nur um 15 % (Schneider und Schlegel 1981). Darüber hinaus werden cytoplasmatische Peroxidasen und Katalasen, die bei H<sub>2</sub>-getriebenem, lithoautotrophem Wachstum verstärkt synthetisiert werden (Kohlmann *et al.* 2011), wahrscheinlich die schnelle Zersetzung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O vorantreiben. Für die Reduktion von Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid sind nur zwei Elektronen und zwei Protonen notwendig (Schema 1). Es stellt sich die Frage, in welchem Redoxzustand das [NiFe]-Zentrum mit Sauerstoff reagiert.

Entweder könnte das reduzierte [NiFe]-Zentrum im  $\text{Ni}_a\text{-C}$ -Zustand mit einem Hydrid in der verbrückenden Position zwischen Eisen und Nickel (Abbildung 41D) oder das [NiFe]-Zentrum im  $\text{Ni}_a\text{-S}$ -Zustand ohne Bückenligand (Abbildung 41C) mit Sauerstoff reagieren. Die beiden Elektronen, die für die Produktion eines Wasserstoffperoxidmoleküls benötigt werden, könnten entweder beide vom Hydrid stammen oder von den [Fe-S]-Clustern und dem Nickel im Oxidationszustand +II geliefert werden (Abbildung 41). Interessanterweise wurde die Insertion von molekularem Sauerstoff in Übergangsmetall-Hydridbindungen und die damit einhergehende Bildung von Metall-Hydroperoxid für mehrere, insbesondere nickelhydridhaltige Modellkomplexe gezeigt (Schlangen und Schwarz 2008). Dies unterstützt das Modell, dass die zwei Elektronen von dem Hydrid der SH im  $\text{Ni}_a\text{-C}$ -Zustand stammen. Ein Modell des Schutzes des [NiFe]-Zentrums der SH vor Sauerstoff ist in Abbildung 41 dargestellt. Nach Reaktion des Hydrids mit Sauerstoff würde ein Hydroperoxidligand als Intermediat am  $\text{Ni}^{\text{III}}$  entstehen (Abbildung 41A). Allerdings wurde bislang mittels EPR-Spektroskopie kein paramagnetisches  $\text{Ni}^{\text{III}}$  im aktiven Zentrum der oxidierten SH festgestellt (Kapitel 3.1.3). Entweder ist der Zustand zu kurzlebig, so dass er noch nicht nachgewiesen wurde, oder es existiert eine antiferromagnetische Kopplung zu einem benachbarten Redoxzentrum, die zur EPR-Inaktivität führt. Nach der Reduktion des einen Hydroperoxidliganden tragenden [NiFe]-Zentrums (Abbildung 41A), und gleichzeitiger Übertragung eines Protons, wird Wasserstoffperoxid freigesetzt. Dadurch wird der  $\text{Ni}_a\text{-S}$ -Zustand (Abbildung 41C) regeneriert, der wieder mit Wasserstoff reagieren kann.

Erstaunlicherweise förderte in die SH rekonstituiertes FMN-a die Wasserproduktion (Kapitel 3.5.8). Im Falle flavinhaltiger NADH-Peroxidasen läuft die Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser über die Bildung eines Cys-SOH-Derivats ab. Das Cys-SOH-Derivat wird vom reduzierten Flavinkofaktor durch zweifache Elektronenübertragung reduziert, sodass Wasser freigesetzt wird (siehe Details in Kapitel 4.6.5; Poole und Claiborne 1989; Yeh *et al.* 1996). Ein ähnlicher Mechanismus ist für die Wasserproduktion am [NiFe]-Zentrum denkbar (Abbildung 41). Durch Zwei-Elektronenübertragung von FMN-a auf ein Cys-SO(H)-Derivat (Abbildung 41B) würde der Sauerstoff mit Hilfe zweier Protonen zu Wasser reduziert werden. Das niedrige Redoxpotential von NADH ( $E^\circ(\text{NAD}^+/\text{NADH}) = -320$  mV) ist notwendig für die Reduktion der Sauerstoffmodifikationen an Cysteinen. Das weit höhere Redoxpotential des Chinonpools (+90 mV) ist dagegen vermutlich nicht ausreichend, um das [NiFe]-Zentrum in membrangebundenen Hydrogenasen vor Sauerstoff in gleicher Weise zu schützen. Nach dem aktuellen Modell der Sauerstofftoleranz der MBH (Goris *et al.* 2011) werden für die schnelle Reduktion von  $\text{O}_2$  zu einem Wassermolekül vier Elektronen

benötigt. Das zweite Sauerstoffatom wird dabei als Hydroxyligand zwischen dem Eisen und dem Nickel im aktiven Zentrum ( $\text{Ni}_r\text{B}$ ) gebunden. Zwei der drei benötigten Elektronen für die Sauerstoffreduktion stammen dabei wahrscheinlich von dem außergewöhnlichen proximalen  $[\text{4Fe-3S}]$ -Cluster der MBH. Nach Protonierung des Hydroxyliganden wird dieser als Wasser freigesetzt. Anschließend muss ein weiteres Elektron übertragen werden, um das Nickel im aktiven Zentrum zu Ni zurück zur Oxidationsstufe +II zu reduzieren.

Die oxidierte SH ist allerdings EPR-inaktiv. Ein typischer  $\text{Ni}_r\text{B}$ -Zustand wird nicht ausgebildet (Kapitel 3.1.3). Die Kernresonanz-Schwingungsspektroskopie („nuclear resonance vibrational spectroscopy“ NRVS) wäre eine geeignete Technik, um die oxidierte SH zu untersuchen. Die Synchrotron-basierte Schwingungsspektroskopie für das Mössbauer-aktive Isotop  $^{57}\text{Fe}$  liefert im Idealfall Informationen über sämtliche Schwingungsmoden des Eisens und seiner Liganden. Da nur  $^{57}\text{Fe}$  angeregt bzw. betrachtet wird, besitzt NRVS, ähnlich wie die Raman-Spektroskopie, eine ausgezeichnete Element-Selektivität, hat aber den Vorteil, nicht den gleichen optischen Selektionsregeln der Raman- oder der Infrarot-Spektroskopie zu unterliegen. Außerdem können quantitative Aussagen über Schwingungsamplituden getroffen werden. Allerdings ist die Frequenzauflösung etwas geringer als bei der Raman- oder IR-Spektroskopie (Zeng *et al.* 2007). NRVS an der SH könnte die Detektion aller Schwingungen der Eisen-Liganden, inklusive der vorgeschlagenen Sauerstoffliganden (Fe-O), erlauben. Für die eindeutige Zuordnung der Schwingungen zu den Sauerstoffliganden könnte eine Isotopenmarkierung durchgeführt werden. Dafür müsste die frisch isolierte, oxidierte SH zunächst reaktiviert werden. Die Inkubation von reaktivierter SH mit dem Isotop  $^{18}\text{O}_2$  würde dann zum Einbau von  $^{18}\text{O}$  in das aktive Zentrum erlauben, was wiederum zu markanten Änderungen der Fe-O-Schwingungsmoden führen würde.

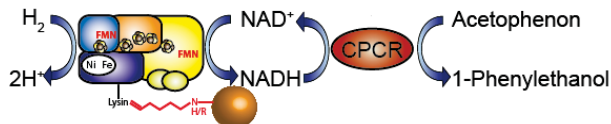
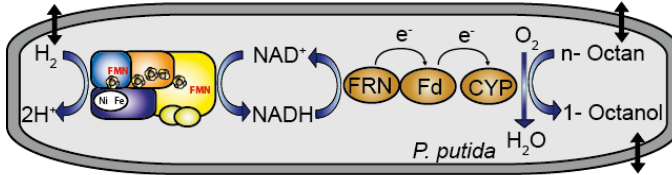
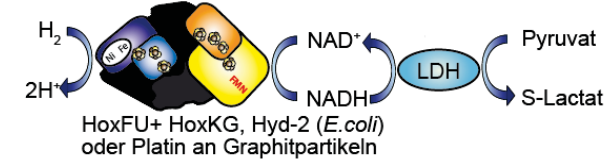
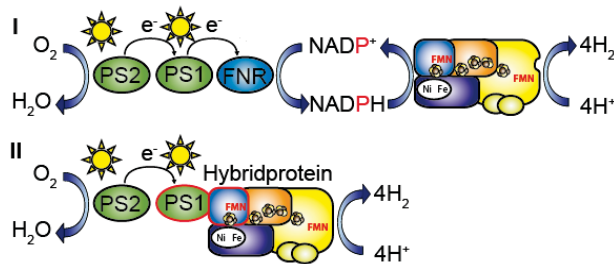
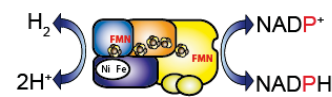
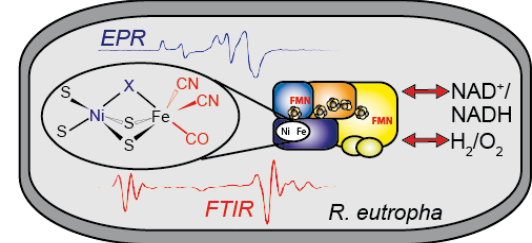
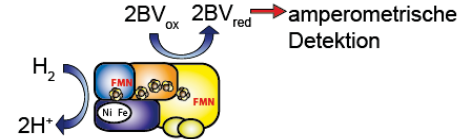
Für die Reaktivierung des  $[\text{NiFe}]$ -Zentrums mit einer Sauerstoffmodifikation an einem verbrückten Cystein (Abbildung 41B) werden zwei weitere Elektronen benötigt, die den Daten in dieser Arbeit zufolge wahrscheinlich über FMN-a transferiert werden. Eine alternative Quelle wäre ein Elektron vom proximalen Cluster in HoxY und ein weiteres Elektron von einem anderen  $[\text{Fe-S}]$ -Cluster. Der proximale Cluster der SH weist in der näheren Umgebung zusätzliche Cysteine auf. Die XAS-Experimente lassen allerdings vermuten, dass es sich bei diesem Kofaktor um einen konventionellen  $[\text{4Fe-4S}]$ -Cluster handelt. Im Gegensatz zu diesem Kofaktor kann der außergewöhnliche proximale  $[\text{4Fe3S}]$ -Cluster der MBH, der durch sechs Cysteine koordiniert wird, drei Redox-Zustände bei physiologischen Redoxpotentialen einnehmen, um zwei Elektronen zur Verfügung zu stellen (Fritsch *et al.* 2011; Goris *et al.* 2011).

Die SH katalysiert zwei verschiedene Reaktionen am [NiFe]-Zentrum, einerseits die reversible H<sub>2</sub>-Oxidation zu Protonen und Elektronen als Hauptreaktion und andererseits die O<sub>2</sub>-Reduktion zu Wasserstoffperoxid und Wasser als Nebenreaktion. Die Fähigkeit eines Enzyms, mehrere Reaktionen an demselben aktiven Zentrum zu katalysieren, wird als katalytische Promiskuität bezeichnet (O'Brien und Herschlag 1999). Ein Beispiel stellt die Pyridoxalphosphat-abhängige Racemase aus *Geobacillus stearothermophilus* dar, die auch eine sehr geringe Aldolaseaktivität zeigt. Durch einen Aminosäureaustausch konnte die Aldolaseaktivität allerdings um das 2x10<sup>5</sup>fache gesteigert werden (Seebeck und Hilvert 2003). Die Eigenschaft der katalytischen Promiskuität ermöglicht der SH in Gegenwart von 40% Sauerstoff bis zu zwei Prozent der Elektronen aus der H<sub>2</sub>-Oxidation für die reduktive Entgiftung von O<sub>2</sub> zu nutzen.

#### **4.9 Einsatz der SH in der Kofaktorregeneration**

Die H<sub>2</sub>-abhängige NAD<sup>+</sup>-Reduktion wird in Gegenwart atmosphärischer O<sub>2</sub>-Konzentrationen kaum merklich beeinträchtigt. Aufgrund der Sauerstofftoleranz, ist die SH ein vielversprechendes Enzym für die biotechnologische NADH-Regeneration. Die direkte elektrochemische Reduktion von NADH ist von Nachteil, da bioinaktive Nebenprodukte erzeugt und hohe Überpotentiale benötigt werden. Daher ist ein enzymbasiertes System mit hoher Selektivität und milden Reaktionsbedingungen attraktiv. Eine weit verbreitete Methode der NADH-Regeneration ist die Kopplung der NAD<sup>+</sup>-Reduktion mit der Oxidation von Formiat zu CO<sub>2</sub> durch die Formiat-Dehydrogenase. Außerdem wird die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase für die Regeneration sowohl von NADH als auch NADPH verwendet. Ebenso wurden verschiedene andere Dehydrogenasen einschließlich der Phosphit-Dehydrogenasen für die Kofaktorregenerierung getestet (Weckbecker *et al.* 2010; Hall und Bommarius 2011). In diesem Zusammenhang bietet die Verwendung einer NAD<sup>+</sup>-reduzierenden Hydrogenase in der Kofaktorregenerierung den Vorteil, dass außer Protonen keine weiteren Nebenprodukte entstehen. Die Protonen werden in dem gekoppelten Enzymsystem wieder verwendet, weshalb die Atomeffizienz bei 100 % liegt (siehe Abbildung 42A).



**A) In vitro Kofaktorregenerierung und Stabilisierung****C) Zellbasierte Kofaktorregenerierung****E) Modularer Ansatz zur Kofaktorregenerierung****G) Lichtgetriebene Wasserstoffproduktion****B) Erweiterung des Substratspektrums****D) Redoxsensor****F) H2-Sensor**

**Abb. 42: Biotechnologische Anwendungen der SH.** **A:** NADH-Regeneration zur gekoppelten Reduktion von Acetophenon zu 1-Phenylethanol durch eine Carbonylreduktase (CPCR). Gezeigt ist ebenfalls die Stabilitätsverbesserung durch kovalente Verknüpfung an Harzperlen (nicht gezeigt ist die Stabilisierung durch PEG-Modifikation) (Ratzka *et al.* 2011; Ratzka *et al.* 2012). **B:** Umwandlung der NAD(H)- in eine NADP(H)- Bindestelle für die NADPH-Regeneration **C** Zellbasierte NADH-Regenerierung für die Monooxygenase-abhängige Biotransformation von n-Octan zu 1-Octanol. Schwarze Pfeile repräsentieren Diffusion der Substrate/Produkte durch die Zellhülle. **D** Spektroskopische Detektion des zellulären Redoxzustandes durch die Interaktion (rote Pfeile) der SH mit dem cytoplasmatischen NAD<sup>+</sup>/NADH-Pool und H<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> über das Diaphorase- bzw. das Hydrogenase-Modul. **E** Modularer Ansatz bestehend aus dem HoxFU-Komplex und einer Hydrogenase oder Platin entsprechend den gewünschten Reaktionsbedingungen (Reeve *et al.* 2012) **F:** Bestimmung der H<sub>2</sub>-Konzentrationen über SH-abhängige Benzylviologen-Reduktion. Das reduzierte Benzylviologen kann anschließend durch Oxidation an einer Elektrodenoberfläche chronoamperometrisch nachgewiesen werden. Die detektierte Stromstärke ist dabei proportional zur H<sub>2</sub>-Konzentration (Lutz *et al.* 2005). **G:** Zwei Ansätze zur lichtgetriebenen Wasserstoffproduktion **GI:** Kopplung der SH zum Photosystem über NADPH, siehe Ansatz I **GII:** über ein Fusionsprotein bestehend aus Photosystem I und SH (mit roter Umrandung) z. B. über die Untereinheiten PsaE mit HoxY. Zur Vereinfachung wurde Cytochrom *b<sub>6f</sub>* und Ferredoxin und die Etablierung des Systems in Cyanobakterien nicht abgebildet. Abkürzungen: CYP, Cytochrom-P450-Monooxygenase; Fd, Ferredoxin; PS1, PS2, Photosystem I+II; FNR/FRN, Ferredoxin-NAD(P)H-Reduktase; LDH, Laktat-Dehydrogenase; Ph, Phenyl; BV, Benzylviologen; red, reduziert; ox, oxidiert.

Zudem lässt sich die SH in großen Mengen reinigen und dissoziiert nicht in die Submodule (Kapitel 3.2), wie es die bidirektionalen Hydrogenasen aus *R. opacus* oder *A. vinosum* tun (Schneider *et al.* 1984; Long *et al.* 2007). Die Anwendung der nativen SH in der Regeneration von NADH wurde bereits in mehreren Studien beschrieben (Payen *et al.* 1983; Okura *et al.* 1990; Hasumi *et al.* 1996; Andersson *et al.* 1998; Rundback *et al.* 2012).



Neben NADH dient auch NADPH als Kofaktor vieler biotechnologisch relevanter Oxidoreduktasen. Außerdem ist der Preis für NADPH etwa zehnfach höher als der für NADH (Sigma Aldrich 2012). Im Rahmen der Dissertationsarbeit konnte die Umwandlung der NAD(H)-Bindestelle der SH in eine NADP(H)-Bindetasche vorangetrieben werden (Abbildung 42B; Kapitel 3.6). Die Verbesserung der katalytischen Effizienz für die wasserstoffabhängige  $\text{NADP}^+$ -Reduktion als Folge der Aminosäureaustausche D340A und E341A in HoxF spricht für sterische Hinderung und elektrostatische Abstoßung von  $\text{NADP}^+$  in der nativen NAD(H)-Bindetasche. Des Weiteren verbesserten die Aminosäureaustausche D401K und D467S die  $\text{H}_2$ -getriebene  $\text{NADP}^+$ -Reduktion. Die Proteinausbeute der meisten SH-Derivate lag in der Größenordnung der nativen SH. Die Ausbeute und der Reinheitsgrad der SH-Derivate mit  $\text{HoxF}^{\text{D340A}}$ ,  $\text{HoxF}^{\text{E341A}}$  und  $\text{HoxF}^{\text{D340A E341A}}$  könnte durch Umklonierung der entsprechenden SH-Gene von dem Weit-Wirtsbereich-Plasmid pCM62 in das Plasmid pEDY309 vermutlich noch gesteigert werden, da das letztere Plasmid in *R. eutropha* offensichtlich eine größere Stabilität ausweist (O. Lenz, persönliche Mitteilung).

Das  $\text{HoxF}^{\text{E341A,D467S}}$ -Derivat wies eine deutliche Präferenzverschiebung von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADP}^+$  auf. Zwar erreichte die wasserstoffabhängige  $\text{NADP}^+$ -Reduktionsaktivität dieses Derivats nur ungefähr 1 % der Wildtypaktivität für  $\text{NAD}^+$ , dennoch war sie mit 1,3 U/mg vergleichbar mit der Aktivität des „besten“ FDH-Derivats, welches  $\text{NADP}^+$  reduziert (2,5 U/mg) (Tishkov und Popov 2006). Die hohe spezifische Aktivität der  $\text{NADP}^+$ -abhängigen Glucose-Dehydrogenase (20–100 U/mg) ist der dem SH-Derivat allerdings klar überlegen. Jedoch entsteht bei der Kofaktorregeneration durch die Glukose-Dehydrogenase aus Glukose Glukonsäure, die aufwändig aus dem gewünschten Endprodukt entfernt werden muss.

Jedoch sind weitere Arbeiten notwendig, um die katalytische Effizienz für die wasserstoffabhängige  $\text{NADP}^+$ -Reduktion zu steigern. Das fehlende lithoautotrophe Wachstum des  $\text{SH}^{\text{E341A,D467S}}$ -Stammes macht ihn zu einem ausgezeichneten Ausgangspunkt für weitere Verbesserungen durch gerichtete Evolution. Durch ungerichtete Mutagenese der „Rossmann-Falte“ und anschließende Selektion auf die Fähigkeit, wieder lithoautotroph zu wachsen, könnte die katalytische Effizienz der  $\text{H}_2$ -abhängigen  $\text{NADP}^+$ -Reduktion weiter verbessert werden. Allerdings könnten Revertanten entstehen, die wieder die wasserstoffabhängige  $\text{NAD}^+$ -Reduktion der Wildtyp-SH zeigen. Nach einer weiteren Verbesserung in Richtung der NADP(H)-Präferenz wäre es interessant herauszufinden, ob sich das pH-Wertoptimum durch die eingebrachten Aminosäuresubstitutionen verschiebt. Der  $\text{pK}_\text{S}$ -Wert einer Aminosäure gibt Aufschluss über die Protonierung bei einem bestimmten pH-Wert. Dabei ist der  $\text{pK}_\text{S}$ -Wert einer Aminosäure auch abhängig von der Proteinumgebung (Kieseritzky und Knapp 2008).

Durch die Substitution zweier negativ geladener Aminosäuren zu ungeladenen Aminosäuren in dem SH<sup>E341A D467S</sup>-Derivat könnte sich das pH-Optimum für die wasserstoffabhängige NAD<sup>+</sup> bzw. für die NADP<sup>+</sup> verändert haben.

In Zusammenarbeit mit Dr. Juliane Ratzka aus der Gruppe von Prof. Marion Ansorge-Schumacher an der Technischen Universität Berlin wurde die native SH in einer gekoppelten Enzymreaktion mit der Carbonyl-Reduktase aus *Candida parapsilosis* eingesetzt (Abbildung 42A). Es konnte gezeigt werden, dass eine nahezu quantitative Umwandlung des Substrates Acetophenon stattfand und dieses System eine weit höhere Gesamtumsatzrate im Vergleich zur weit verbreiteten FDH aufwies (Ratzka *et al.* 2011). Ein Problem für die SH-Stabilität stellen allerdings die in der organischen Synthese eingesetzten Lösungsmittel dar. Durch Modifikation der SH mit mPEG konnte die SH-Halbwertszeit (wasserstoffabhängige NAD<sup>+</sup>-Reduktion) in Gegenwart von 10 % (v/v) Isopropanol von 0,1 auf 0,5 h verbessert werden. Allerdings wurde die Stabilität in wässriger Lösung nicht weiter verbessert (Ratzka *et al.* 2012). Im Rahmen der Zusammenarbeit wurde die SH darüber hinaus sowohl durch adsorptive als auch kovalente Bindung an das makroporöse Harz „Amberlite™ FPA54“ immobilisiert (Abbildung 42A). Die Halbwertszeit der SH wurde durch die kovalente Immobilisierung in wässriger Lösung von 5,3 h um den Faktor 3,6 auf 19 h erhöht (Herr *et al.* 2013). Bei mechanischer Beanspruchung der SH erhöhte sich die Halbwertszeit von 1,9 h durch die Immobilisierung um den Faktor sechs. In drei verschiedenen organischen Lösungsmittelgemischen (jeweils 10 % v/v) bewirkte die Immobilisierung sogar eine bis zu 159-fache Stabilitätserhöhung. Somit wurde ein Enzympräparat mit hoher Stabilität und Aktivität entwickelt. Es entspricht somit den industriellen Anforderungen für eine ökonomische NADH-Regenerierung.

Das isolierte Diaphorase-Modul der SH stellt aufgrund seiner hohen Umsatzraten und der katalytischen Aktivität über einen weiten Potentialbereich ein vielversprechendes System für die elektrochemische Regeneration von NAD<sup>+</sup> und NADH dar (Kapitel 3.4). In Zusammenarbeit mit der Gruppe von Dr. Kylie Vincent (Oxford University) wurde der Diaphorase-Subkomplex der SH in einen modularen Ansatz für die Kofaktorregeneration eingesetzt. Dabei wurde sowohl das Diaphorase-Modul als auch eine Hydrogenase an pyrolitische Graphitpartikeln adsorbiert, so dass beide elektrisch verbunden waren (Abbildung 42E; Reeve *et al.* 2012). Das System kann durch Auswahl geeigneter Hydrogenasen an unterschiedliche Reaktionsbedingungen angepasst werden und ist daher komplett modular.

Viele verschiedene Hydrogenasen, die sich jeweils leicht in ihrem pH- und Temperaturoptimum, und ihrer O<sub>2</sub>-Toleranz unterscheiden, wurden bereits isoliert und

elektrochemisch untersucht, (Vincent *et al.* 2005; Vignais und Billoud 2007; Pandelia *et al.* 2010). Mittels der Laktat-Dehydrogenase, die zusammen mit Hyd-2 aus *E.coli* und HoxFU aus *R. eutropha* auf Graphitpartikel wurde, konnte die erfolgreiche Substratumwandlung am Beispiel der Pyruvat-Reduktion demonstriert werden (Reeve *et al.* 2012). Ein weiterer Vorteil der Immobilisierung an Graphitpartikeln ist, dass sie durch Zentrifugation nach dem Ende einer Reaktion einfach abgetrennt und so für eine erneute Reaktion wiederverwendet werden können. Das modulare Graphit-Partikel-System wurde im Rahmen der Doktorarbeit zur Patentierung angemeldet.

Für den biotechnologischen Einsatz werden heutzutage immer noch größtenteils isolierte Enzyme eingesetzt (Weckbecker *et al.* 2010). Allerdings ist die Reinigung von Enzymen teuer und zeitaufwändig. Aus diesem Grund ist die Etablierung von Ganzzellsystemen für die Biotransformation sehr attraktiv (Berman *et al.* 2000). Zuvor konnte bereits die Produktion einer bidirektionalen Hydrogenase aus dem Aktinomyceten *Rhodococcus opacus* in *R. eutropha* gezeigt werden (Porthun *et al.* 2002). Allerdings wurden nur die vier Strukturproteine der Hydrogenase mit der dazugehörigen Endoprotease heterolog synthetisiert, der Maturationsapparat des [NiFe]-Zentrums stammte aus *R. eutropha*. Für die wasserstoffabhängige *In-vivo*-NAD<sup>+</sup>-Regeneration wurde die SH heterolog in dem nicht-pathogenen Stamm, *P. putida* KT2440, produziert (Kapitel 3.7 und Abbildung 42C), der für Biotransformationen häufig verwendet wird und sich durch seine Lösungsmittelresistenz auszeichnet (Ramos *et al.* 2002; Niewerth *et al.* 2011). Für die heterologe SH-Produktion in *P. putida* wurde ein 13 Gene umfassendes Expressionplasmid eingesetzt. Der native SH-Promotor wurde dabei gegen den *alkB*-Promoter, der durch Alkane induzierbar ist, ausgetauscht. Der komplexe SH-Biosyntheseapparat führte im hydrogenasefreien  $\gamma$ -Proteobakterium *P. putida* zu vollständig assembliertem und funktionalem SH-Protein.

Die funktionelle Expression von Genen in heterologen Wirten wird häufig durch ineffiziente oder unvollständige Transkription großer Genregionen, den Verlust der Funktion nativer Promotoren, das Vorhandensein von Transkriptionsterminationsregionen oder Fehler bei der Initiation der Translation im Falle von polycistronischen Transkripten beeinträchtigt (Arvani *et al.* 2012) (McCrory *et al.* 2012). Die heterologe Produktion aktiver SH in *P. putida*, bei der die Synthese von 13 funktionellen Proteinen notwendig ist, zeigt, dass sich *R. eutropha* und *P. putida* hinsichtlich der Transkription von Operons und des Kofaktoreinbaus ähneln. In Kooperation mit der Gruppe von Prof. Bernhard Hauer (Universität Stuttgart) ist auf diese Ergebnisse aufbauend geplant, die wasserstoffabhängige Kofaktorregeneration in ganzen Zellen für die Umwandlung von n-Octan zu 1-Octanol durch die heterolog produzierte SH in

---

Verbindung mit einer rekombinanten Monooxygenase zu untersuchen. Insbesondere die Synthese von höherwertigen Produkten aus einfachen Kohlenstoffverbindungen wie Alkanen, CO<sub>2</sub>, oder Glycerin mit H<sub>2</sub> als Reduktionsmittel kann sich wirtschaftlich und ökologisch lohnen. Zudem ist bei dem Einsatz der SH keine Produkttrennung von kohlenstoffhaltigen Abfällen, die bei anderen Kofaktorregenerationssystemen entstehen, notwendig. Außerdem ermöglicht die O<sub>2</sub>-Toleranz der SH ihre Verwendung in gekoppelten enzymatischen Reaktionen, in denen O<sub>2</sub> erforderlich ist (z. B. Monooxygenasen). Ein breiteres Spektrum von Machbarkeitsstudien sind nun notwendig, um die Anwendbarkeit der SH in Kombination mit unterschiedlichen NADH-abhängigen Oxidoreduktasen zu demonstrieren. Außerdem müsste die Übertragung der Laborergebnisse auf einen großtechnischen Maßstab getestet werden. Weitere Verbesserung der katalytischen Eigenschaften der SH (Optimierung der katalytischen Effizienz für die NADP<sup>+</sup>-Reduktion, Veränderung des pH- und Temperaturoptimums) durch molekularbiologische Methoden könnten den Effizienz der SH in der Kofaktorregeneration weiter steigern.

## 5. Literaturverzeichnis

- Abramovitz, A. S. und V. Massey. **1976**. Interaction of phenols with old yellow enzyme. Physical evidence for charge-transfer complexes. *J Biol Chem*, 251: 5327-5336.
- Adams, M. W., **1990**. The structure and mechanism of iron-hydrogenases. *Biochim Biophys Acta*, 1020: 115-145.
- Albracht, S. P. und R. Hedderich. **2000**. Learning from hydrogenases: location of a proton pump and of a second FMN in bovine NADH--ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *FEBS Lett*, 485: 1-6.
- Albracht, S. P. J., **1993**. Intimate-relationships of the large and the small subunits of all nickel hydrogenases with 2 nuclear-encoded subunits of mitochondrial NADH - ubiquinone oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta-Bioenergetics*, 1144: 221-224.
- Albracht, S. P. J. und R. Hedderich. **2000**. Learning from hydrogenases: location of a proton pump and of a second FMN in bovine NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *FEBS Lett*, 485: 1-6.
- Albracht, S. P. J., A. Mariette und P. de Jong. **1997**. Bovine-heart NADH:ubiquinone oxidoreductase is a monomer with 8 Fe-S clusters and 2 FMN groups. *Biochim Biophys Acta-Bioenergetics*, 1318: 92-106.
- Albracht, S. P. J., E. van der Linden und B. W. Faber. **2003**. Quantitative amino acid analysis of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) and related enzymes. Consequences for the number of prosthetic groups. *Biochim Biophys Acta-Bioenergetics*, 1557: 41-49.
- Andersson, M., H. Holmberg und P. Adlercreutz. **1998**. Evaluation of *Alcaligenes eutrophus* cells as an NADH regenerating catalyst in organic-aqueous two-phase system. *Biotechnol Bioeng*, 57: 79-86.
- Appel, J., S. Phunpruch, K. Steinmüller und R. Schulz. **2000**. The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC 6803 works as an electron valve during photosynthesis. *Arch Microbiol*, 173: 333-338.
- Appel, J. und R. Schulz. **1996**. Sequence analysis of an operon of a NAD(P)-reducing nickel hydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 gives additional evidence for direct coupling of the enzyme to NAD(P)H-dehydrogenase (complex I). *Biochim Biophys Acta*, 1298: 141-147.
- Armstrong, F. A., N. A. Belsey, J. A. Cracknell, G. Goldet, A. Parkin, E. Reisner, K. A. Vincent und A. F. Wait. **2009**. Dynamic electrochemical investigations of hydrogen oxidation and production by enzymes and implications for future technology. *Chemical Society Reviews*, 38: 36-51.
- Armstrong, F. A. und J. C. Fontecilla-Camps. **2008**. Biochemistry. A natural choice for activating hydrogen. *Science*, 321: 498-499.
- Armstrong, F. A. und J. Hirst. **2011**. Reversibility and efficiency in electrocatalytic energy conversion and lessons from enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 14049-14054.
- Arnold, K., L. Bordoli, J. Kopp und T. Schwede. **2006**. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22: 195-201.
- Arvani, S., A. Markert, A. Loeschcke, K. E. Jaeger und T. Drepper. **2012**. A T7 RNA polymerase-based toolkit for the concerted expression of clustered genes. *J Biotechnol*, 159: 162-171.
- Atlas, R. M., **2004**. In: *Handbook of Microbiological Media* S.180.
- Aubert-Jousset, E., M. Cano, G. Guedeney, P. Richaud und L. Cournac. **2011**. Role of HoxE subunit in *Synechocystis* PCC6803 hydrogenase. *The FEBS Journal*, 278: 4035-4043.



- Babtie, A. C., S. Bandyopadhyay, L. F. Olguin und F. Hollfelder. **2009**. Efficient catalytic promiscuity for chemically distinct reactions. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48: 3692-3694.
- Bagdasarian, M., R. Lurz, B. Ruckert, F. C. H. Franklin, M. M. Bagdasarian, J. Frey und K. N. Timmis. **1981**. Specific-purpose plasmid cloning vectors .2. Broad host range, high copy number, Rsf1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene*, 16: 237-247.
- Bagley, K. A., E. C. Duin, W. Roseboom, S. P. J. Albracht und W. H. Woodruff. **1995**. Infrared-detectable groups sense changes in charge-density on the nickel center in hydrogenase from *Chromatium vinosum*. *Biochemistry*, 34: 5527-5535.
- Barker, C. D., T. Reda und J. Hirst. **2007**. The flavoprotein subcomplex of complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from bovine heart mitochondria: insights into the mechanisms of NADH oxidation and NAD<sup>+</sup> reduction from protein film voltammetry. *Biochemistry*, 46: 3454-3464.
- Bashyam, R. und P. Zelenay. **2006**. A class of non-precious metal composite catalysts for fuel cells. *Nature*, 443: 63-66.
- Benkert, P., M. Biasini und T. Schwede. **2011**. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27: 343-350.
- Bennett, B. D., E. H. Kimball, M. Gao, R. Osterhout, S. J. Van Dien und J. D. Rabinowitz. **2009**. Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nat Chem Biol*, 5: 593-599.
- Bento, I., L. O. Martins, G. G. Lopes, M. A. Carrondo und P. F. Lindley. **2005**. Dioxygen reduction by multi-copper oxidases; a structural perspective. *Dalton Trans*, 3507-3513.
- Berman, H. M., T. N. Bhat, P. E. Bourne, Z. Feng, G. Gilliland, H. Weissig und J. Westbrook. **2000**. The Protein Data Bank and the challenge of structural genomics. *Nat Struct Biol*, 7 Suppl: 957-959.
- Berman, H. M., J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov und P. E. Bourne. **2000**. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, 28: 235-242.
- Bernhard, M., B. Benelli, A. Hochkoeppler, D. Zannoni und B. Friedrich. **1997**. Functional and structural role of the cytochrome *b* subunit of the membrane-bound hydrogenase complex of *Alcaligenes eutrophus* H16. *Eur J Biochem*, 248: 179-186.
- Bernhard, M., E. Schwartz, J. Rietdorf und B. Friedrich. **1996**. The *Alcaligenes eutrophus* membrane-bound hydrogenase gene locus encodes functions involved in maturation and electron transport coupling. *J Bacteriol*, 178: 4522-4529.
- Berrisford, J. M. und L. A. Sazanov. **2009**. Structural basis for the mechanism of respiratory complex I. *J Biol Chem*, 284: 29773-29783.
- Berrisford, J. M., C. J. Thompson und L. A. Sazanov. **2008**. Chemical and NADH-induced, ROS-dependent, cross-linking between subunits of complex I from *Escherichia coli* and *Thermus thermophilus*. *Biochemistry*, 47: 10262-10270.
- Birnboim, H. C. und J. Doly. **1979**. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7: 1513-1523.
- Bleijlevens, B., T. Buhrke, E. van der Linden, B. Friedrich und S. P. Albracht. **2004**. The auxiliary protein HypX provides oxygen tolerance to the soluble [NiFe]-hydrogenase of *Ralstonia eutropha* H16 by way of a cyanide ligand to nickel. *J Biol Chem*, 279: 46686-46691.
- Bleijlevens, B., F. A. van Broekhuizen, A. L. De Lacey, W. Roseboom, V. M. Fernandez und S. P. Albracht. **2004**. The activation of the [NiFe]-hydrogenase from *Allochromatium vinosum*. An infrared spectro-electrochemical study. *J Biol Inorg Chem*, 9: 743-752.
- Blokesch, M., S. P. Albracht, B. F. Matzanke, N. M. Drapal, A. Jacobi und A. Böck. **2004**. The complex between hydrogenase-maturation proteins HypC and HypD is an



- intermediate in the supply of cyanide to the active site iron of [NiFe]-hydrogenases. *J Mol Biol*, 344: 155-167.
- Blokesch, M. und A. Böck. **2002**. Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*: the HypC cycle. *J Mol Biol*, 324: 287-296.
- Blokesch, M., A. Paschos, A. Bauer, S. Reissmann, N. Drapal und A. Böck. **2004**. Analysis of the transcarbamoylation-dehydration reaction catalyzed by the hydrogenase maturation proteins HypF and HypE. *Eur J Biochem*, 271: 3428-3436.
- Böck, A., P. W. King, M. Blokesch und M. C. Posewitz. **2006**. Maturation of hydrogenases. *Adv Microb Physiol*, 51: 1-71.
- Boison, G., H. Bothe, A. Hansel und P. Lindblad. **1999**. Evidence against a common use of the diaphorase subunits by the bidirectional hydrogenase and by the respiratory complex I in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 174: 159-165.
- Boison, G., O. Schmitz, B. Schmitz und H. Bothe. **1998**. Unusual gene arrangement of the bidirectional hydrogenase and functional analysis of its diaphorase subunit HoxU in respiration of the unicellular cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Curr. Microbiol*, 36: 253-258.
- Bowien, B. und B. Kusian. **2002**. Genetics and control of CO(2) assimilation in the chemoautotroph *Ralstonia eutropha*. *Arch Microbiol*, 178: 85-93.
- Braun, M., S. Bungert und T. Friedrich. **1998**. Characterization of the overproduced NADH dehydrogenase fragment of the NADH : ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 37: 1861-1867.
- Brecht, M., M. van Gastel, T. Buhrke, B. Friedrich und W. Lubitz. **2003**. Direct detection of a hydrogen ligand in the [NiFe] center of the regulatory H<sub>2</sub>-sensing hydrogenase from *Ralstonia eutropha* in its reduced state by HYSCORE and ENDOR spectroscopy. *J Am Chem Soc*, 125: 13075-13083.
- Buhrke, T., O. Lenz, N. Krauss und B. Friedrich. **2005**. Oxygen tolerance of the H<sub>2</sub>-sensing [NiFe] hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 is based on limited access of oxygen to the active site. *J Biol Chem*, 280: 23791-23796.
- Buhrke, T., O. Lenz, A. Porthun und B. Friedrich. **2004**. The H<sub>2</sub>-sensing complex of *Ralstonia eutropha*: interaction between a regulatory [NiFe] hydrogenase and a histidine protein kinase. *Mol Microbiol*, 51: 1677-1689.
- Burgdorf, T., A. L. De Lacey und B. Friedrich. **2002**. Functional analysis by site-directed mutagenesis of the NAD<sup>+</sup>-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *J Bacteriol*, 184: 6280-6288.
- Burgdorf, T., O. Lenz, T. Buhrke, E. van der Linden, A. K. Jones, S. P. Albracht und B. Friedrich. **2005**. [NiFe]-hydrogenases of *Ralstonia eutropha* H16: modular enzymes for oxygen-tolerant biological hydrogen oxidation. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 10: 181-196.
- Burgdorf, T., S. Löscher, P. Liebisch, E. Van der Linden, M. Galander, F. Lendzian, W. Meyer-Klaucke, S. P. J. Albracht, B. Friedrich, H. Dau und M. Haumann. **2005**. Structural and oxidation-state changes at its nonstandard Ni-Fe site during activation of the NAD-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha* detected by X-ray absorption, EPR, and FTIR spectroscopy. *J Am Chem Soc*, 127: 576-592.
- Burgdorf, T., E. van der Linden, M. Bernhard, Q. Y. Yin, J. W. Back, A. F. Hartog, A. O. Muijsers, C. G. de Koster, S. P. Albracht und B. Friedrich. **2005**. The soluble NAD<sup>+</sup>-Reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 consists of six subunits and can be specifically activated by NADPH. *J Bacteriol*, 187: 3122-3132.
- Chandrayan, S. K., P. M. McTernan, R. C. Hopkins, J. Sun, F. E. Jenney, Jr. und M. W. Adams. **2011**. Engineering the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* to overproduce its cytoplasmic [NiFe]-hydrogenase. *J Biol Chem*, 287:3257-3264.

- Conrad, R., **1996**. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases ( $H_2$ ,  $CO$ ,  $CH_4$ ,  $OCS$ ,  $N_2O$ , and  $NO$ ). *Microbiol Rev*, 60: 609.
- Constant, P., S. P. Chowdhury, L. Hesse, J. Pratscher und R. Conrad. **2011**. Genome data mining and soil survey for the novel group 5 [NiFe]-hydrogenase to explore the diversity and ecological importance of presumptive high-affinity  $H_2$ -oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 77: 6027-6035.
- Coplen, T. B. (2002). Compilation of minimum and maximum isotope ratios of selected elements in naturally occurring terrestrial materials and reagents. Reston, Virginia, U.S. Dept. of the Interior, U.S. Geological Survey.
- Cotton, F. A. und G. Wilkinson. **1988**. in *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley, S. 1299.
- Cracknell, J. A., A. F. Wait, O. Lenz, B. Friedrich und F. A. Armstrong. **2009**. A kinetic and thermodynamic understanding of  $O_2$  tolerance in [NiFe]-hydrogenases. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Cramm, R., **2009**. Genomic view of energy metabolism in *Ralstonia eutropha* H16. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 16: 38-52.
- Darensbourg, M. Y. und C. A. Grapperhaus. **1998**. Oxygen capture by sulfur in nickel thiolates. *Accounts Chem Res*, 31: 451-459.
- Darensbourg, M. Y., E. J. Lyon und J. J. Smee. **2000**. The bio-organometallic chemistry of active site iron in hydrogenases. *Coord Chem Rev*, 206: 533-561.
- Darnault, C., A. Volbeda, E. J. Kim, P. Legrand, X. Vernede, P. A. Lindahl und J. C. Fontecilla-Camps. **2003**. Ni-Zn-[ $Fe_4-S_4$ ] and Ni-Ni-[ $Fe_4-S_4$ ] clusters in closed and open subunits of acetyl-CoA synthase/carbon monoxide dehydrogenase. *Nature Structural Biology*, 10: 271-279.
- Dau, H., P. Liebisch und M. Haumann. **2003**. X-ray absorption spectroscopy to analyze nuclear geometry and electronic structure of biological metal centers--potential and questions examined with special focus on the tetra-nuclear manganese complex of oxygenic photosynthesis. *Anal Bioanal Chem*, 376: 562-583.
- De Lacey, A. L., V. M. Fernandez, M. Rousset und R. Cammack. **2007**. Activation and inactivation of hydrogenase function and the catalytic cycle: spectroelectrochemical studies. *Chem Rev*, 107: 4304-4330.
- De Lacey, A. L., E. C. Hatchikian, A. Volbeda, M. Frey, J. C. Fontecilla-Camps und V. M. Fernandez. **1997**. Infrared spectroelectrochemical characterization of the [NiFe] hydrogenase of *Desulfovibrio gigas*. *J Am Chem Soc*, 119: 7181-7189.
- Dementin, S., B. Burlat, A. L. De Lacey, A. Pardo, G. Adryanczyk-Perrier, B. Guigliarelli, V. M. Fernandez und M. Rousset. **2004**. A glutamate is the essential proton transfer gate during the catalytic cycle of the [NiFe] hydrogenase. *J Biol Chem*, 279: 10508-10513.
- Dobbek, H., V. Svetlitchnyi, L. Gremer, R. Huber und O. Meyer. **2001**. Crystal structure of a carbon monoxide dehydrogenase reveals a [Ni-4Fe-5S] cluster. *Science*, 293: 1281-1285.
- Dole, F., A. Fournel, V. Magro, E. C. Hatchikian, P. Bertrand und B. Guigliarelli. **1997**. Nature and electronic structure of the Ni-X dinuclear center of *Desulfovibrio gigas* hydrogenase. Implications for the enzymatic mechanism. *Biochemistry*, 36: 7847-7854.
- Efremov, R. G., R. Baradaran und L. A. Sazanov. **2010**. The architecture of respiratory complex I. *Nature*, 465: 441-445.
- Efremov, R. G. und L. A. Sazanov. **2012**. The coupling mechanism of respiratory complex I - A structural and evolutionary perspective. *Biochim Biophys Acta*, 817:1785-1795
- Erkens, A., K. Schneider und A. Müller. **1996**. The NAD linked soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16: Detection and characterization of EPR signals deriving from nickel and flavin. *J Biol Inorg Chem*, 1: 99-110.

- Esterhazy, D., M. S. King, G. Yakovlev und J. Hirst. **2008**. Production of reactive oxygen species by complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from *Escherichia coli* and comparison to the enzyme from mitochondria. *Biochemistry*, 47: 3964-3971.
- Farmer, P. J., J. N. Verpeaux, C. Amatore, M. Y. Darensbourg und G. Musie. **1994**. Reduction-promoted sulfur-oxygen bond-cleavage in a nickel sulfenate as a model for the activation of [NiFe] hydrogenase. *J Am Chem Soc*, 116: 9355-9356.
- Fernandez, V. M., E. C. Hatchikian und R. Cammack. **1985**. Properties and reactivation of two different deactivated forms of *Desulfovibrio gigas* hydrogenase. *Biochim Biophys Acta- Protein Structure und Molecular Enzymology*, 832: 69-79.
- Fichtner, C., C. Laurich, E. Bothe und W. Lubitz. **2006**. Spectroelectrochemical characterization of the [NiFe] hydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *Biochemistry*, 45: 9706-9716.
- Förster, S., M. van Gastel, M. Brecht und W. Lubitz. **2005**. An orientation-selected ENDOR and HYSCORE study of the Ni-C active state of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F hydrogenase. *J Biol Inorg Chem*, 10: 51-62.
- Fontecilla-Camps, J. C., A. Volbeda, C. Cavazza und Y. Nicolet. **2007**. Structure/function relationships of [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenases. *Chem Rev*, 107: 4273-4303.
- Forzi, L. und R. G. Sawers. **2007**. Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*. *Biometals*, 20: 565-578.
- Fourmond, V., P. Infossi, M. T. Giudici-Orticoni, P. Bertrand und C. Leger. **2010**. "Two-step" chronoamperometric method for studying the anaerobic inactivation of an oxygen tolerant NiFe hydrogenase. *J Am Chem Soc*, 132: 4848-4857.
- Friedrich, B., E. Heine, A. Finck und C. G. Friedrich. **1981**. Nickel requirement for active hydrogenase formation in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol*, 145: 1144-1149.
- Friedrich, C. G., **1982**. Depression of hydrogenase during limitation of electron donors and derepression of ribulosebiphosphate carboxylase during carbon limitation of *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol*, 149: 203-210.
- Friedrich, C. G., B. Friedrich und B. Bowien. **1981**. Formation of enzymes of autotrophic metabolism during heterotrophic growth of *Alcaligenes-eutrophus*. *J Gen Microbiol*, 122: 69-78.
- Frielingsdorf, S., T. Schubert, A. Pohlmann, O. Lenz und B. Friedrich. **2011**. A trimeric supercomplex of the oxygen-tolerant membrane-bound [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16. *Biochemistry*, 50: 10836-10843.
- Fritsch, J., O. Lenz und B. Friedrich. **2011**. The maturation factors HoxR and HoxT contribute to oxygen tolerance of membrane-bound [NiFe] hydrogenase in *Ralstonia eutropha* H16. *J Bacteriol*, 193: 2487-2497.
- Fritsch, J., P. Scheerer, S. Frielingsdorf, S. Kroschinsky, B. Friedrich, O. Lenz und C. M. Spahn. **2011**. The crystal structure of an oxygen-tolerant hydrogenase uncovers a novel iron-sulphur centre. *Nature*, 479: 249-252.
- Garcin, E., X. Vernede, E. C. Hatchikian, A. Volbeda, M. Frey und J. C. Fontecilla-Camps. **1999**. The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center. *Structure*, 7: 557-566.
- Gavrikova, E. V., V. G. Grivennikova, V. D. Sled, T. Ohnishi und A. D. Vinogradov. **1995**. Kinetics of the mitochondrial three-subunit NADH dehydrogenase interaction with hexammineruthenium(III). *Biochim Biophys Acta*, 1230: 23-30.
- Gay, P., D. Le Coq, M. Steinmetz, T. Berkelman und C. I. Kado. **1985**. Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria. *J Bacteriol*, 164: 918-921.
- Germer, F., I. Zebger, M. Saggu, F. Lendzian, R. Schulz und J. Appel. **2009**. Overexpression, isolation, and spectroscopic characterization of the bidirectional [NiFe] hydrogenase from *Synechocystis* sp PCC 6803. *J Biol Chem*, 284: 36462-36472.

- Gitlitz, P. H. und A. I. Krasna. **1975**. Structural and catalytic properties of hydrogenase from *Chromatium*. *Biochemistry*, 14: 2561-2568.
- Goldet, G., C. Brandmayr, S. T. Stripp, T. Happe, C. Cavazza, J. C. Fontecilla-Camps und F. A. Armstrong. **2009**. Electrochemical kinetic investigations of the reactions of [FeFe]-hydrogenases with carbon monoxide and oxygen: comparing the importance of gas tunnels and active-site electronic/redox effects. *J Am Chem Soc*, 131: 14979-14989.
- Goldet, G., A. F. Wait, J. A. Cracknell, K. A. Vincent, M. Ludwig, O. Lenz, B. Friedrich und F. A. Armstrong. **2008**. Hydrogen production under aerobic conditions by membrane-bound hydrogenases from *Ralstonia* species. *J Am Chem Soc*, 130: 11106-11113.
- Goris, T., A. F. Wait, M. Saggu, J. Fritsch, N. Heidary, M. Stein, I. Zebger, F. Lendzian, F. A. Armstrong, B. Friedrich und O. Lenz. **2011**. A unique iron-sulfur cluster is crucial for oxygen tolerance of a [NiFe]-hydrogenase. *Nat Chem Biol*, 7: 310-318.
- Grant, S. G. N., J. Jessee, F. R. Bloom und D. Hanahan. **1990**. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 4645-4649.
- Grellier, M., L. Vendier und S. Sabo-Etienne. **2007**. Ruthenium complexes carrying hydride, dihydrogen, and phosphine ligands: reversible hydrogen release. *Angew Chem Int Ed Engl*, 46: 2613-2615.
- Gu, Z. J., J. Dong, C. B. Allan, S. B. Choudhury, R. Franco, J. J. G. Moura, J. LeGall, A. E. Przybyla, W. Roseboom, S. P. J. Albracht, M. J. Axley, R. A. Scott und M. J. Maroney. **1996**. Structure of the Ni sites in hydrogenases by X-ray absorption spectroscopy. Species variation and the effects of redox poise. *J Am Chem Soc*, 118: 11155-11165.
- Gurvich, L. V., I. V. Veyts, C. B. Alcock, **1989**. Thermodynamic properties of individual substances. New York, *Hemisphere Pub Corp*
- Hall, M. und A. S. Bommarius. **2011**. Enantioenriched compounds *via* enzyme-catalyzed redox reactions. *Chem Rev*, 111: 4088-4110.
- Happe, R. P., W. Roseboom, G. Egert, C. G. Friedrich, C. Massanz, B. Friedrich und S. P. Albracht. **2000**. Unusual FTIR and EPR properties of the H<sub>2</sub>-activating site of the cytoplasmic NAD-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *FEBS Lett*, 466: 259-263.
- Happe, R. P., W. Roseboom, A. J. Pierik, S. P. Albracht und K. A. Bagley. **1997**. Biological activation of hydrogen. *Nature*, 385: 126.
- Hasumi, F., K. Fukuoka, S. Adachi, Y. Miyamoto und I. Okura. **1996**. Synthesis of alanine and leucine by reductive amination of 2-oxoic acid with combination of hydrogenase and dehydrogenase. *Appl Biochem Biotechnol*, 56: 341-344.
- Herr, N., J. Ratzka, L. Lauterbach, L. Lenz und M. B. Ansorge-Schumacher. **2013**. Stabilisation of an O<sub>2</sub>-tolerant NAD<sup>+</sup>-reducing [NiFe]-hydrogenase by a combination of immobilisation and chemical modification. akzeptiert in *J. Mol. Catal. B: Enzym*.
- Higuchi, M., Y. Yamamoto, L. B. Poole, M. Shimada, Y. Sato, N. Takahashi und Y. Kamio. **1999**. Functions of two types of NADH oxidases in energy metabolism and oxidative stress of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*, 181: 5940-5947.
- Hinchliffe, P. und L. A. Sazanov. **2005**. Organization of iron-sulfur clusters in respiratory Complex I. *Science*, 309: 771-774.
- Hirst, J., **2010**. Towards the molecular mechanism of respiratory Complex I. *Biochemical Journal*, 425: 327-339.
- Hopkins, R. C., J. Sun, F. E. Jenney, Jr., S. K. Chandrayan, P. M. McTernan und M. W. Adams. **2011**. Homologous expression of a subcomplex of *Pyrococcus furiosus* hydrogenase that interacts with pyruvate ferredoxin oxidoreductase. *PloS one*, 6: e26569.



- Horch, M., L. Lauterbach, O. Lenz, P. Hildebrandt und I. Zebger. **2012**. NAD(H)-coupled hydrogen cycling - structure-function relationships of bidirectional [NiFe] hydrogenases. *FEBS Lett*, 586: 545-556.
- Horch, M., Y. Rippers, M. A. Mroginia, P. Hildebrandt und I. Zebger. **2012**. Combining spectroscopy and theory to evaluate structural models of metalloenzymes: a case study on the soluble [NiFe] hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *Chemphyschem*, 14;14(1):185-91
- Imlay, J. A., **1995**. A metabolic enzyme that rapidly produces superoxide, fumarate reductase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 270: 19767-19777.
- Johannssen, W., H. Gerberding, M. Rohde, C. Zaborosch und F. Mayer. **1991**. Structural aspects of the soluble NAD-dependent hydrogenase isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16 and from *Nocardia opaca* 1b. *Archives of Microbiology*, 155: 303-308.
- Johnson, B. F. und R. Y. Stanier. **1971**. Dissimilation of aromatic compounds by *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol*, 107: 468-475.
- Johnson, J. K. und D. K. Srivastava. **1993**. Detection and identification of a chromophoric intermediate during the medium-chain fatty acyl-CoA dehydrogenase-catalyzed reaction via rapid-scanning UV/visible spectroscopy. *Biochemistry*, 32: 8004-8013.
- Jones, A. K., S. E. Lamle, H. R. Pershad, K. A. Vincent, S. P. Albracht und F. A. Armstrong. **2003**. Enzyme electrokinetics: electrochemical studies of the anaerobic interconversions between active and inactive states of *Allochromatium vinosum* [NiFe]-hydrogenase. *J Am Chem Soc*, 125: 8505-8514.
- Jones, A. K., O. Lenz, A. Strack, T. Buhrke und B. Friedrich. **2004**. NiFe hydrogenase active site biosynthesis: identification of Hyp protein complexes in *Ralstonia eutropha*. *Biochemistry*, 43: 13467-13477.
- Karthein, R., W. Nastainczyk und H. H. Ruf. **1987**. EPR study of ferric native prostaglandin H synthase and its ferrous NO derivative. *Eur J Biochem*, 166: 173-180.
- Keefe, R. G., M. J. Axley und A. L. Harabin. **1995**. Kinetic mechanism studies of the soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Arch Biochem Biophys*, 317: 449-456.
- Kellers, P., M. E. Pandelia, L. J. Currell, H. Gerner und W. Lubitz. **2009**. FTIR study on the light sensitivity of the [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F: Ni-C to Ni-L photoconversion, kinetics of proton rebinding and H/D isotope effect. *Phys Chem Chem Phys*, 11: 8680-8683.
- Kerstens, K., J. De Ley, D. H. Bergey, J. G. Holt, N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley und S. T. Williams **1984**. Genus *Alcaligenes* Castellani and Chalmers 1919 in: Bergey's Manual of systematic bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins.
- Kieseritzky, G. und E. W. Knapp. **2008**. Optimizing pKa computation in proteins with pH adapted conformations. *Proteins*, 71: 1335-1348.
- Kleihues, L., O. Lenz, M. Bernhard, T. Buhrke und B. Friedrich. **2000**. The H(2) sensor of *Ralstonia eutropha* is a member of the subclass of regulatory [NiFe] hydrogenases. *J Bacteriol*, 182: 2716-2724.
- Klibanov, A. M. und A. V. Puglisi. **1980**. The Regeneration of Coenzymes Using Immobilized Hydrogenase. *Biotechnol Lett*, 2: 445-450.
- Klockenkämper, R. **1997**. Total-reflection X-ray fluorescence analysis. New York, Wiley.
- Kohlmann, Y., A. Pohlmann, A. Otto, D. Becher, R. Cramm, S. Lutte, E. Schwartz, M. Hecker und B. Friedrich. **2011**. Analyses of soluble and membrane proteomes of *Ralstonia eutropha* H16 reveal major changes in the protein complement in adaptation to lithoautotrophy. *J Proteome Res*, 10: 2767-2776.
- Kohlstadt, M., K. Dorner, R. Labatzke, C. Koc, R. Hielscher, E. Schiltz, O. Einsle, P. Hellwig und T. Friedrich. **2008**. Heterologous production, isolation, characterization and crystallization of a soluble fragment of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) from *Aquifex aeolicus*. *Biochemistry*, 47: 13036-13045

- Kömen, R., K. Schmidt und B. Friedrich. **1992**. Hydrogenase mutants of *Alcaligenes eutrophus* H16 show alterations in the electron-transport system. *FEMS Microbiol Lett*, 96: 173-178.
- Kortluke, C. und B. Friedrich. **1992**. Maturation of membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* H16. *J Bacteriol*, 174: 6290-6293.
- Krassen, H., A. Schwarze, B. Friedrich, K. Ataka, O. Lenz und J. Heberle. **2009**. Photosynthetic hydrogen production by a hybrid complex of photosystem I and [NiFe]-hydrogenase. *ACS Nano*, 3: 4055-4061.
- Kubas, G. J., **2007**. Fundamentals of H<sub>2</sub> binding and reactivity on transition metals underlying hydrogenase function and H<sub>2</sub> production and storage. *Chem Rev*, 107: 4152-4205.
- Kuhn, M., A. Steinbüchel und H. G. Schlegel. **1984**. Hydrogen evolution by strictly aerobic hydrogen bacteria under anaerobic conditions. *J Bacteriol*, 159: 633-639.
- Kurkin, S., S. J. George, R. N. Thorneley und S. P. Albracht. **2004**. Hydrogen-induced activation of the [NiFe]-hydrogenase from *Allochromatium vinosum* as studied by stopped-flow infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 43: 6820-6831.
- Kusmaul, L. und J. Hirst. **2006**. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 7607-7612.
- Laemmli, U. K., **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Le Goff, A., V. Artero, B. Jousselme, P. D. Tran, N. Guillet, R. Metaye, A. Fihri, S. Palacin und M. Fontecave. **2009**. From hydrogenases to noble metal-free catalytic nanomaterials for H<sub>2</sub> production and uptake. *Science*, 326: 1384-1387.
- Leach, M. R. und D. B. Zamble. **2007**. Metallocenter assembly of the hydrogenase enzymes. *Curr Opin Chem Biol*, 11: 159-165.
- Lee, S. Y. und S. J. Park (2005). Fermentative production of short-chain-length PHAs. . Biotechnology of Biopolymers—From Synthesis to Patents. Editors A. Steinbüchel and Y. Doi.
- Lenz, O., M. Bernhard, T. Buhrke, E. Schwartz und B. Friedrich. **2002**. The hydrogen-sensing apparatus in *Ralstonia eutropha*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 4: 255-262.
- Lenz, O. und B. Friedrich. **1998**. A novel multicomponent regulatory system mediates H<sub>2</sub> sensing in *Alcaligenes eutrophus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 12474-12479.
- Lenz, O., M. Ludwig, T. Schubert, I. Bürstel, S. Ganskow, T. Goris, A. Schwarze und B. Friedrich. **2010**. H<sub>2</sub> conversion in the presence of O<sub>2</sub> as performed by the membrane-bound [NiFe]-hydrogenase of *Ralstonia eutropha*. *Chemphyschem*, 11: 1107-1119.
- Lenz, O., E. Schwartz, J. Darnedde, M. Eitingen und B. Friedrich. **1994**. The *Alcaligenes eutrophus* H16 *hoxX* gene participates in hydrogenase regulation. *J Bacteriol*, 176: 4385-4393.
- Lespinat, P. A., Y. Berlier, G. Fauque, M. Czechowski, B. Dimon und J. Le Gall. **1986**. The pH dependence of proton-deuterium exchange, hydrogen production and uptake catalyzed by hydrogenases from sulfate-reducing bacteria. *Biochimie*, 68: 55-61.
- Liebgott, P. P., F. Leroux, B. Burlat, S. Dementin, C. Baffert, T. Lautier, V. Fourmond, P. Ceccaldi, C. Cavazza, I. Meynial-Salles, P. Soucaille, J. C. Fontecilla-Camps, B. Guigliarelli, P. Bertrand, M. Rousset und C. Leger. **2010**. Relating diffusion along the substrate tunnel and oxygen sensitivity in hydrogenase. *Nat Chem Biol*, 6: 63-70.
- Lill, S. O. und P. E. Siegbahn. **2009**. An autocatalytic mechanism for NiFe-hydrogenase: reduction to Ni(I) followed by oxidative addition. *Biochemistry*, 48: 1056-1066.
- Lippard, S. J. und J. M. Berg **1994**. Principles of bioinorganic chemistry. in Mill Valley, Calif., University Science Books.
- Long, M., J. Liu, Z. Chen, B. Bleijlevens, W. Roseboom und S. P. Albracht. **2007**. Characterization of a HoxEFUYH type of [NiFe] hydrogenase from *Allochromatium*



- vinosum* and some EPR and IR properties of the hydrogenase module. *J Biol Inorg Chem*, 12: 62-78.
- Löscher, S., T. Burgdorf, T. Buhrke, B. Friedrich, H. Dau und M. Haumann. **2005**. Non-standard structures of the Ni-Fe cofactor in the regulatory and the NAD-reducing hydrogenases from *Ralstonia eutropha*. *Biochem Soc Trans*, 33: 25-27.
- Lountos, G. T., R. Jiang, W. B. Wellborn, T. L. Thaler, A. S. Bommarius und A. M. Orville. **2006**. The crystal structure of NAD(P)H oxidase from *Lactobacillus sanfranciscensis*: insights into the conversion of O<sub>2</sub> into two water molecules by the flavoenzyme. *Biochemistry*, 45: 9648-9659.
- Lubitz, W., E. Reijerse und M. van Gastel. **2007**. [NiFe] and [FeFe] hydrogenases studied by advanced magnetic resonance techniques. *Chem Rev*, 107: 4331-4365.
- Ludwig, M., J. A. Cracknell, K. A. Vincent, F. A. Armstrong und O. Lenz. **2009**. Oxygen-tolerant H<sub>2</sub> oxidation by membrane-bound [NiFe] hydrogenases of *Ralstonia* species. Coping with low level H<sub>2</sub> in air. *J Biol Chem*, 284: 465-477.
- Lukey, M. J., A. Parkin, M. M. Roessler, B. J. Murphy, J. Harmer, T. Palmer, F. Sargent und F. A. Armstrong. **2010**. How *Escherichia coli* is equipped to oxidize hydrogen under different redox conditions. *J Biol Chem*, 285: 3928-3938.
- Luo, J. H., B. van Loo und S. C. L. Kamerlin. **2012**. Catalytic promiscuity in *Pseudomonas aeruginosa* arylsulfatase as an example of chemistry-driven protein evolution. *FEBS Letters*, 586: 1622-1630.
- Lutz, B. J., Z. H. Fan, T. Burgdorf und B. Friedrich. **2005**. Hydrogen sensing by enzyme-catalyzed electrochemical detection. *Anal Chem*, 77: 4969-4975.
- Maier, T. und A. Bock. **1996**. Generation of active [NiFe] hydrogenase *in vitro* from a nickel-free precursor form. *Biochemistry*, 35: 10089-10093.
- Maroti, J., A. Farkas, I. K. Nagy, G. Maroti, E. Kondorosi, G. Rakhely und K. L. Kovacs. **2010**. A second soluble Hox-type NiFe enzyme completes the hydrogenase set in *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *Appl Environ Microbiol*, 76: 5113-5123.
- Martin, W. und M. Muller. **1998**. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature*, 392: 37-41.
- Marx, C. J. und M. E. Lidstrom. **2001**. Development of improved versatile broad-host-range vectors for use in methylotrophs and other Gram-negative bacteria. *Microbiology*, 147: 2065-2075.
- Massanz, C., V. M. Fernandez und B. Friedrich. **1997**. C-terminal extension of the H<sub>2</sub>-activating subunit, HoxH, directs maturation of the NAD-reducing hydrogenase in *Alcaligenes eutrophus*. *Eur J Biochem*, 245: 441-448.
- Massanz, C., S. Schmidt und B. Friedrich. **1998**. Subforms and *in vitro* reconstitution of the NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol*, 180: 1023-1029.
- Massey, V., **1994**. Activation of Molecular-Oxygen by Flavins and Flavoproteins. *J Biol Chem*, 269: 22459-22462.
- Massey, V. und G. Palmer. **1966**. On existence of spectrally distinct classes of Flavoprotein Semiquinones. A new method for quantitative production of Flavoprotein Semiquinones. *Biochemistry*, 5: 3181-3189.
- Mayhew, S. G., **1978**. The redox potential of dithionite and SO<sub>2</sub> from equilibrium reactions with flavodoxins, methyl viologen and hydrogen plus hydrogenase. *Eur J Biochem*, 85: 535-547.
- McCrary, C. C., C. Uyeda und J. C. Peters. **2012**. Electrocatalytic hydrogen evolution in acidic water with molecular cobalt tetraazamacrocycles. *J Am Chem Soc*, 134: 3164-3170.
- McIntosh, C. L., F. Germer, R. Schulz, J. Appel und A. K. Jones. **2011**. The [NiFe]-hydrogenase of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 works bidirectionally with a bias to H<sub>2</sub> production. *J Am Chem Soc*, 133: 11308-11319.

- Millo, D., M. E. Pandelia, T. Utesch, N. Wisitruangsakul, M. A. Mroginski, W. Lubitz, P. Hildebrandt und I. Zebger. **2009**. Spectroelectrochemical study of the [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F in solution and immobilized on biocompatible gold surfaces. *J Phys Chem B*, 113: 15344-15351.
- Montet, Y., P. Amara, A. Volbeda, X. Vernede, E. C. Hatchikian, M. J. Field, M. Frey und J. C. Fontecilla-Camps. **1997**. Gas access to the active site of Ni-Fe hydrogenases probed by X-ray crystallography and molecular dynamics. *Nat Struct Biol*, 4: 523-526.
- Morina, K., M. Schulte, F. Hubrich, K. Dorner, S. Steimle, S. Stolpe und T. Friedrich. **2011**. Engineering the Respiratory Complex I to Energy-converting NADPH:Ubiquinone Oxidoreductase. *J Biol Chem*, 286: 34627-34634.
- Müller, A., A. Erkens, K. Schneider, A. Muller, H. F. Nolting, V. A. Sole und G. Henkel. **1997**. NADH-induced changes of the nickel coordination within the active site of the soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus*: XAFS investigations on three states distinguishable by EPR spectroscopy. *Angew Chem Int Edit*, 36: 1747-1750.
- Mullis, K. B. und F. A. Faloon. **1987**. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*, 155: 335-350.
- Neubauer, O., A. Alfandega, J. Schoknecht, U. Sternberg, A. Pohlmann und T. Eitinger. **2009**. Two essential Arginine residues in the T Components of Energy-Coupling Factor Transporters. *J Bacteriol*, 191: 6482-6488.
- Niewerth, H., K. Bergander, S. R. Chhabra, P. Williams und S. Fetzner. **2011**. Synthesis and biotransformation of 2-alkyl-4(1H)-quinolones by recombinant *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Microbiol Biotechnol*, 91: 1399-1408.
- Niu, S. Q., L. M. Thomson und M. B. Hall. **1999**. Theoretical characterization, of the reaction intermediates in a model of the nickel-iron hydrogenase of *Desulfovibrio gigas*. *J Am Chem Soc*, 121: 4000-4007.
- Nöll, G., **2008**. Spectroscopic investigation of flavoproteins: Mechanistic differences between (electro)chemical and photochemical reduction and oxidation. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry*, 200: 34-38.
- O'Brien, P. J. und D. Herschlag. **1999**. Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities. *Chemistry & Biology*, 6: R91-R105.
- Ogata, H., S. Hirota, A. Nakahara, H. Komori, N. Shibata, T. Kato, K. Kano und Y. Higuchi. **2005**. Activation process of [NiFe] hydrogenase elucidated by high-resolution X-ray analyses: conversion of the ready to the unready state. *Structure*, 13: 1635-1642.
- Ogata, H., P. Kellers und W. Lubitz. **2010**. The crystal structure of the [NiFe] hydrogenase from the photosynthetic bacterium *Allochrochromatium vinosum*: characterization of the oxidized enzyme (Ni-A state). *J Mol Biol*, 402: 428-444.
- Ogata, H., W. Lubitz und Y. Higuchi. **2009**. [NiFe] hydrogenases: structural and spectroscopic studies of the reaction mechanism. *Dalton Trans*: 7577-7587.
- Ogata, H., Y. Mizoguchi, N. Mizuno, K. Miki, S. Adachi, N. Yasuoka, T. Yagi, O. Yamauchi, S. Hirota und Y. Higuchi. **2002**. Structural studies of the carbon monoxide complex of [NiFe]hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F: suggestion for the initial activation site for dihydrogen. *J Am Chem Soc*, 124: 11628-11635.
- Okafuji, A., T. Biskup, K. Hitomi, E. D. Getzoff, G. Kaiser, A. Batschauer, A. Bacher, J. Hidema, M. Teranishi, K. Yamamoto, E. Schleicher und S. Weber. **2010**. Light-induced activation of class II cyclobutane pyrimidine dimer photolyases. *DNA Repair (Amst)*, 9: 495-505.
- Okura, I., K. Otsuka, N. Nakada und F. Hasumi. **1990**. Regeneration of NADH and ketone hydrogenation by hydrogen with the combination of hydrogenase and alcohol dehydrogenase. Scientific note. *Appl Biochem Biotech*, 24-25: 425-430.

- Olson, J. W., N. S. Mehta und R. J. Maier. **2001**. Requirement of nickel metabolism proteins HypA and HypB for full activity of both hydrogenase and urease in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*, 39: 176-182.
- Pandelia, M. E., V. Fourmond, P. Tron-Infossi, E. Lojou, P. Bertrand, C. Leger, M. T. Giudici-Orticoni und W. Lubitz. **2010**. Membrane-Bound Hydrogenase I from the Hyperthermophilic Bacterium *Aquifex aeolicus*: Enzyme activation, redox intermediates and oxygen tolerance. *J Am Chem Soc*, 132: 6991-7004.
- Pardo, A., A. L. De Lacey, V. M. Fernandez, H. J. Fan, Y. Fan und M. B. Hall. **2006**. Density functional study of the catalytic cycle of nickel-iron [NiFe] hydrogenases and the involvement of high-spin nickel(II). *J Biol Inorg Chem*, 11: 286-306.
- Payen, B., M. Segui, P. Monsan, K. Schneider, C. G. Friedrich und H. G. Schlegel. **1983**. Use of cytoplasmic hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* for NADH Regeneration. *Biotechnol Lett*, 5: 463-468.
- Perutz, R. N. und S. Sabo-Etienne. **2007**. The sigma-CAM mechanism: sigma complexes as the basis of sigma-bond metathesis at late-transition-metal centers. *Angew Chem Int Edit*, 46: 2578-2592.
- Peters, J. W., W. N. Lanzilotta, B. J. Lemon und L. C. Seefeldt. **1998**. X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (CpI) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science*, 282: 1853-1858.
- Petersen, J. M., F. U. Zielinski, T. Pape, R. Seifert, C. Moraru, R. Amann, S. Hourdez, P. R. Girguis, S. D. Wankel, V. Barbe, E. Pelletier, D. Fink, C. Borowski, W. Bach und N. Dubilier. **2011**. Hydrogen is an energy source for hydrothermal vent symbioses. *Nature*, 476: 176-180.
- Petkun, S., R. Shi, Y. Li, A. Asinas, C. Munger, L. Zhang, M. Waclawek, B. Soboh, R. G. Sawers und M. Cygler. **2011**. Structure of hydrogenase maturation protein HypF with reaction intermediates shows two active sites. *Structure*, 19: 1773-1783.
- Pfützner, J. und H. G. Schlegel. **1973**. Denitrifikation bei *Hydrogenomonas eutropha* Stamm H16. *Archives of Microbiology*, 90: 199-211.
- Pierik, A. J., W. Roseboom, R. P. Happe, K. A. Bagley und S. P. J. Albracht. **1999**. Carbon monoxide and cyanide as intrinsic ligands to iron in the active site of [NiFe]-hydrogenases - NiFe(CN)(2)CO, biology's way to activate H<sub>2</sub>. *J Biol Chem*, 274: 3331-3337.
- Pilkington, S. J., J. M. Skehel, R. B. Gennis und J. E. Walker. **1991**. Relationship between mitochondrial NADH ubiquinone reductase and a bacterial NAD-reducing hydrogenase. *Biochemistry*, 30: 2166-2175.
- Pohlmann, A., W. F. Fricke, F. Reinecke, B. Kusian, H. Liesegang, R. Cramm, T. Eitinger, C. Ewering, M. Potter, E. Schwartz, A. Strittmatter, I. Voss, G. Gottschalk, A. Steinbüchel, B. Friedrich und B. Bowien. **2006**. Genome sequence of the bioplastic-producing "Knallgas" bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nat biotechnol*, 24: 1257-1262.
- Poole, L. B. und A. Claiborne. **1989**. The non-flavin redox center of the streptococcal NADH peroxidase. II. Evidence for a stabilized cysteine-sulfenic acid. *J Biol Chem*, 264: 12330-12338.
- Porthun, A., M. Bernhard und B. Friedrich. **2002**. Expression of a functional NAD-reducing [NiFe] hydrogenase from the gram-positive *Rhodococcus opacus* in the gram-negative *Ralstonia eutropha*. *Arch Microbiol*, 177: 159-166.
- Ragan, C. I., Y. M. Galante, Y. Hatefi und T. Ohnishi. **1982**. Resolution of mitochondrial NADH dehydrogenase and isolation of 2 iron sulfur proteins. *Biochemistry*, 21: 590-594.

- Ramos, J. L., E. Duque, M. T. Gallegos, P. Godoy, M. I. Ramos-Gonzalez, A. Rojas, W. Teran und A. Segura. **2002**. Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 56: 743-768.
- Rangarajan, E. S., A. Asinas, A. Proteau, C. Munger, J. Baardsnes, P. Iannuzzi, A. Matte und M. Cygler. **2008**. Structure of [NiFe] hydrogenase maturation protein HypE from *Escherichia coli* and its interaction with HypF. *J Bacteriol*, 190: 1447-1458.
- Ratzka, J., L. Lauterbach, O. Lenz und M. B. Ansorge-Schumacher. **2011**. Systematic evaluation of the dihydrogen-oxidising and NAD<sup>+</sup>-reducing soluble [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 as a cofactor regeneration catalyst. *Biocatalysis and Biotransformation*, 0: 1-7.
- Ratzka, J., L. Lauterbach, O. Lenz und M. B. Ansorge-Schumacher. **2012**. Stabilisation of the NAD<sup>+</sup>-reducing soluble [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 through modification with methoxy-poly(ethylene) glycol. *J Mol Catal B: Enzym*, 74: 219-223.
- Rauchfuss, T. B., S. M. Contakes, S. C. Hsu, M. A. Reynolds und S. R. Wilson. **2001**. The influence of cyanide on the carbonylation of iron(II): synthesis of Fe-Sr-Cn-Co centers related to the hydrogenase active sites. *J Am Chem Soc*, 123: 6933-6934.
- Reeve, H. A., L. Lauterbach, P. A. Ash, O. Lenz und K. A. Vincent. **2012**. A modular system for regeneration of NAD cofactors using graphite particles modified with hydrogenase and diaphorase moieties. *Chem Commun*, 48: 1589-1591.
- Reissmann, S., E. Hochleitner, H. Wang, A. Paschos, F. Lottspeich, R. S. Glass und A. Böck. **2003**. Taming of a poison: biosynthesis of the NiFe-hydrogenase cyanide ligands. *Science*, 299: 1067-1070.
- Rundback, F., M. Fidanoska und P. Adlercreutz. **2012**. Coupling of permeabilized cells of *Gluconobacter oxydans* and *Ralstonia eutropha* for asymmetric ketone reduction using H<sub>2</sub> as reductant. *J Biotechnol*, 157: 154-158.
- Saggu, M., C. Teutloff, M. Ludwig, M. Brecht, M. E. Pandelia, O. Lenz, B. Friedrich, W. Lubitz, P. Hildebrandt, F. Lendzian und R. Bittl. **2010**. Comparison of the membrane-bound [NiFe] hydrogenases from *R. eutropha* H16 and *D. vulgaris* Miyazaki F in the oxidized ready state by pulsed EPR. *Phys Chem Chem Phys*, 12: 2139-2148.
- Saggu, M., I. Zebger, M. Ludwig, O. Lenz, B. Friedrich, P. Hildebrandt und F. Lendzian. **2009**. Spectroscopic insights into the oxygen-tolerant membrane-associated [NiFe] hydrogenase of *Ralstonia eutropha* H16. *J Biol Chem*, 284: 16264-16276.
- Sambrook, J. und D. W. Russell **2006**. The condensed protocols from Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson. **1977**. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74: 5463-5467.
- Sawers, R. G., **2005**. Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli*. *Biochem Soc Trans*, 33: 42-46.
- Sazanov, L. A. und P. Hinchliffe. **2006**. Structure of the hydrophilic domain of respiratory Complex I from *Thermus thermophilus*. *Science*, 311: 1430-1436.
- Scheller, S., M. Goenrich, R. Boecher, R. K. Thauer und B. Jaun. **2010**. The key nickel enzyme of methanogenesis catalyses the anaerobic oxidation of methane. *Nature*, 465: 606-608.
- Scheps, D., S. H. Malca, H. Hoffmann, B. M. Nestl und B. Hauer. **2011**. Regioselective omega-hydroxylation of medium-chain n-alkanes and primary alcohols by CYP153 enzymes from *Mycobacterium marinum* and *Polaromonas sp.* strain JS666. *Organic & biomolecular chemistry*, 9: 6727-6733.
- Schink, B. und H. G. Schlegel. **1979**. The membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*. I. Solubilization, purification, and biochemical properties. *Biochim Biophys Acta*, 567: 315-324.



- Schlangen, M. und H. Schwarz. **2008**. Insertion of molecular oxygen in transition-metal hydride bonds, oxygen-bond activation, and unimolecular dissociation of metal hydroperoxide intermediates. *Helv Chim Acta*, 91: 379-386.
- Schlegel, H. G., H. Kaltwasser und G. Gottschalk. **1961**. Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien - wachstumsphysiologische Untersuchungen. *Arch Mikrobiol*, 38: 209-&.
- Schmidt, T. G., J. Koepke, R. Frank und A. Skerra. **1996**. Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J Mol Biol*, 255: 753-766.
- Schmitz, O., G. Boison, R. Hilscher, B. Hundeshagen, W. Zimmer, F. Lottspeich und H. Bothe. **1995**. Molecular biological analysis of a bidirectional hydrogenase from cyanobacteria. *Eur J Biochem*, 233: 266-276.
- Schmitz, O., G. Boison, H. Salzmann, H. Bothe, K. Schutz, S. H. Wang und T. Happe. **2002**. HoxE--a subunit specific for the pentameric bidirectional hydrogenase complex (HoxEFUYH) of cyanobacteria. *Biochim Biophys Acta*, 1554: 66-74.
- Schneider, K., R. Cammack und H. G. Schlegel. **1984**. Content and localization of FMN, Fe-S clusters and Nickel in the NAD-Linked Hydrogenase of *Nocardia opaca* 1b. *Eur J Biochem*, 142: 75-84.
- Schneider, K., R. Cammack, H. G. Schlegel und D. O. Hall. **1979**. The iron-sulphur centres of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus*. *Biochim Biophys Acta*, 578: 445-461.
- Schneider, K. und H. G. Schlegel. **1976**. Purification and properties of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H 16. *Biochim Biophys Acta*, 452: 66-80.
- Schneider, K. und H. G. Schlegel. **1978**. Identification and quantitative determination of the flavin component of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 84: 564-571.
- Schneider, K. und H. G. Schlegel. **1981**. Production of superoxide radicals by soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Biochem J*, 193: 99-107.
- Schneider, K., H. G. Schlegel und K. Jochim. **1984**. Effect of Nickel on activity and subunit composition of purified hydrogenase from *Nocardia opaca* 1b. *Eur J Biochem*, 138: 533-541.
- Schroder, O., B. Bleijlevens, T. E. de Jongh, Z. Chen, T. Li, J. Fischer, J. Forster, C. G. Friedrich, K. A. Bagley, S. P. Albracht und W. Lubitz. **2007**. Characterization of a cyanobacterial-like uptake [NiFe] hydrogenase: EPR and FTIR spectroscopic studies of the enzyme from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J Biol Inorg Chem*, 12: 212-233.
- Schwartz, E., T. Buhrke, U. Gerischer und B. Friedrich. **1999**. Positive transcriptional feedback controls hydrogenase expression in *Alcaligenes eutrophus* H16. *J Bacteriol*, 181: 5684-5692.
- Schwartz, E., U. Gerischer und B. Friedrich. **1998**. Transcriptional regulation of *Alcaligenes eutrophus* hydrogenase genes. *J Bacteriol*, 180: 3197-3204.
- Schwartz, E., A. Henne, R. Cramm, T. Eitinger, B. Friedrich und G. Gottschalk. **2003**. Complete nucleotide sequence of pHG1: a *Ralstonia eutropha* H16 megaplasmid encoding key enzymes of H(2)-based lithoautotrophy and anaerobiosis. *J Mol Biol*, 332: 369-383.
- Schwarze, A., **2011**. Light-driven H<sub>2</sub> production by connecting O<sub>2</sub>-tolerant [NiFe]-hydrogenases from *Ralstonia eutropha* H16 with the cyanobacterial photosystem I. *Doktorarbeit*.
- Schwarze, A., M. J. Kopczak, M. Rogner und O. Lenz. **2010**. Requirements for construction of a functional hybrid complex of photosystem I and [NiFe]-hydrogenase. *Appl Environ Microbiol*, 76: 2641-2651.

- Seebeck, F. P. und D. Hilvert. **2003**. Conversion of a PLP-dependent racemase into an aldolase by a single active site mutation. *J Am Chem Soc*, 125: 10158-10159.
- Seefeldt, L. C., B. M. Hoffman und D. R. Dean. **2012**. Electron transfer in nitrogenase catalysis. *Curr Opin Chem Biol*, 16: 19-25.
- Shima, S., O. Pilak, S. Vogt, M. Schick, M. S. Stagni, W. Meyer-Klaucke, E. Warkentin, R. K. Thauer und U. Ermler. **2008**. The crystal structure of [Fe]-hydrogenase reveals the geometry of the active site. *Science*, 321: 572-575.
- Shima, S., M. Schick, J. Kahnt, K. Ataka, K. Steinbach und U. Linne. **2011**. Evidence for acyl-iron ligation in the active site of [Fe]-hydrogenase provided by mass spectrometry and infrared spectroscopy. *Dalton Trans*.
- Shomura, Y., K. S. Yoon, H. Nishihara und Y. Higuchi. **2011**. Structural basis for a [4Fe-3S] cluster in the oxygen-tolerant membrane-bound [NiFe]-hydrogenase. *Nature*, 479: 253-256.
- Siegbahn, P. E., J. W. Tye und M. B. Hall. **2007**. Computational studies of [NiFe] and [FeFe] hydrogenases. *Chem Rev*, 107: 4414-4435.
- Silakov, A., B. Wenk, E. Reijerse und W. Lubitz. **2009**. (14)N HYSCORE investigation of the H-cluster of [FeFe] hydrogenase: evidence for a nitrogen in the dithiol bridge. *Phys Chem Chem Phys*, 11: 6592-6599.
- Simon, R., U. Priefer und A. Pühler. **1983**. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nature biotechnology*, 1: 784 - 791.
- Siurkus, J., J. Panula-Perala, U. Horn, M. Kraft, R. Rimseliene und P. Neubauer. **2010**. Novel approach of high cell density recombinant bioprocess development: optimisation and scale-up from microliter to pilot scales while maintaining the fed-batch cultivation mode of E. coli cultures. *Microb Cell Fact*, 9: 35.
- Sled, V. D. und A. D. Vinogradov. **1993**. Reductive inactivation of the mitochondrial three subunit NADH dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta*, 1143: 199-203.
- Stal, L. J. und R. Moezelaar. **1997**. Fermentation in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 21: 179-211.
- Stein, M. und W. Lubitz. **2004**. Relativistic DFT calculation of the reaction cycle intermediates of [NiFe] hydrogenase: a contribution to understanding the enzymatic mechanism. *J Inorg Biochem*, 98: 862-877.
- Stephenson, M. und L. H. Stickland. **1931**. Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen: The properties of the enzyme. *Biochem J*, 25: 205-214.
- Stevens, R. C., **2000**. High-throughput protein crystallization. *Curr Opin Struct Biol*, 10: 558-563.
- Stojanowic, A., G. J. Mander, E. C. Duin und R. Hedderich. **2003**. Physiological role of the F420-non-reducing hydrogenase (Mvh) from *Methanothermobacter marburgensis*. *Arch Microbiol*, 180: 194-203.
- Stripp, S., O. Sanganas, T. Happe und M. Haumann. **2009**. The structure of the active site H-cluster of [FeFe] hydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* studied by X-ray absorption spectroscopy. *Biochemistry*, 48: 5042-5049.
- Stripp, S. T., G. Goldet, C. Brandmayr, O. Sanganas, K. A. Vincent, M. Haumann, F. A. Armstrong und T. Happe. **2009**. How oxygen attacks [FeFe] hydrogenases from photosynthetic organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 17331-17336.
- Tamagnini, P., E. Leitao, P. Oliveira, D. Ferreira, F. Pinto, D. J. Harris, T. Heidorn und P. Lindblad. **2007**. Cyanobacterial hydrogenases: diversity, regulation and applications. *FEMS Microbiol Rev*, 31: 692-720.
- Thauer, R. K., **1998**. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. 1998 Marjory Stephenson Prize Lecture. *Microbiology*, 144 : 2377-2406.

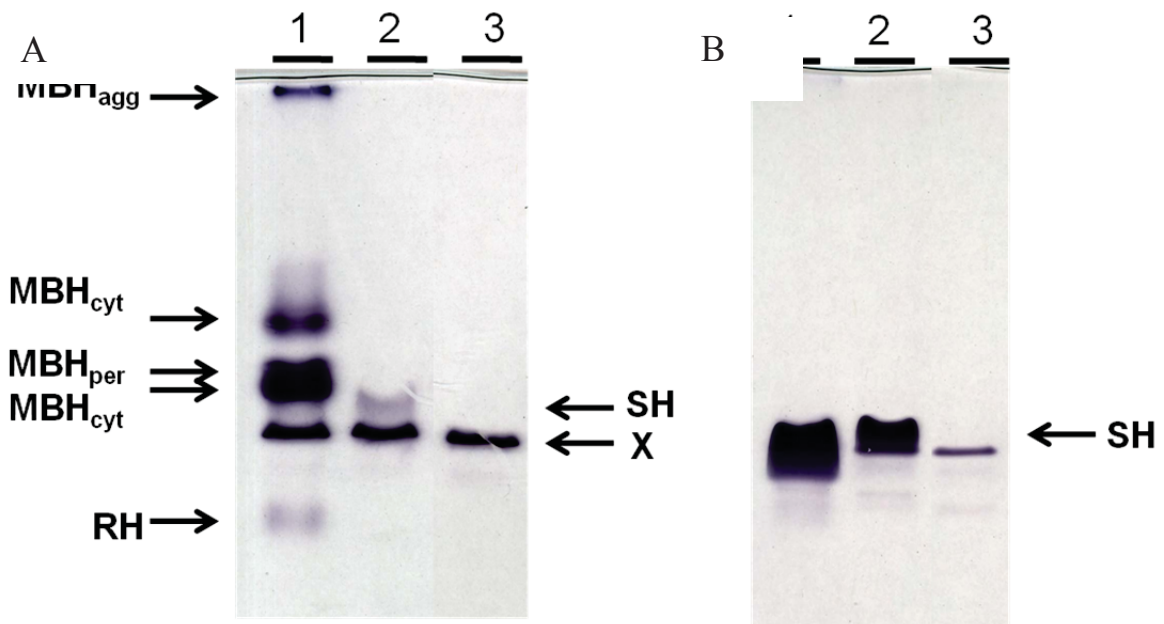


- Thauer, R. K., A. K. Kaster, M. Goenrich, M. Schick, T. Hiromoto und S. Shima. **2010**. Hydrogenases from methanogenic archaea, nickel, a novel cofactor, and H<sub>2</sub> storage. *Annu Rev Biochem*, 79: 507-536.
- Thiemermann, S., J. Dornedde, M. Bernhard, W. Schroeder, C. Massanz und B. Friedrich. **1996**. Carboxyl-terminal processing of the cytoplasmic NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* requires the hoxW gene product. *J Bacteriol*, 178: 2368-2374.
- Tiefenbrunn, T., W. Liu, Y. Chen, V. Katritch, C. D. Stout, J. A. Fee und V. Cherezov. **2011**. High resolution structure of the ba3 cytochrome c oxidase from *Thermus thermophilus* in a lipidic environment. *PloS one*, 6: e22348.
- Tishkov, V. I. und V. O. Popov. **2006**. Protein engineering of formate dehydrogenase. *Biomol Eng*, 23: 89-110.
- Towbin, H., T. Staehelin und J. Gordon. **1979**. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76: 4350-4354.
- Van der Linden, E., T. Burgdorf, M. Bernhard, B. Bleijlevens, B. Friedrich und S. P. Albracht. **2004**. The soluble [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* contains four cyanides in its active site, one of which is responsible for the insensitivity towards oxygen. *J Biol Inorg Chem*, 9: 616-626.
- Van der Linden, E., T. Burgdorf, A. L. de Lacey, T. Buhrke, M. Scholte, V. M. Fernandez, B. Friedrich und S. P. Albracht. **2006**. An improved purification procedure for the soluble [NiFe]-hydrogenase of *Ralstonia eutropha*: new insights into its (in)stability and spectroscopic properties. *J Biol Inorg Chem*, 11: 247-260.
- Van der Linden, E., B. W. Faber, B. Bleijlevens, T. Burgdorf, M. Bernhard, B. Friedrich und S. P. Albracht. **2004**. Selective release and function of one of the two FMN groups in the cytoplasmic NAD<sup>+</sup>-reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *Eur J Biochem*, 271: 801-808.
- Van der Zwaan, J. W., S. P. Albracht, R. D. Fontijn und E. C. Slater. **1985**. Monovalent nickel in hydrogenase from *Chromatium vinosum*. Light sensitivity and evidence for direct interaction with hydrogen. *FEBS Lett*, 179: 271-277.
- Vignais, P. M. und B. Billoud. **2007**. Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chem Rev*, 107: 4206-4272.
- Vignais, P. M., B. Billoud und J. Meyer. **2001**. Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol Rev*, 25: 455-501.
- Vincent, K. A., N. A. Belsey, W. Lubitz und F. A. Armstrong. **2006**. Rapid and reversible reactions of [NiFe]-hydrogenases with sulfide. *J Am Chem Soc*, 128: 7448-7449.
- Vincent, K. A., J. A. Cracknell, O. Lenz, I. Zebger, B. Friedrich und F. A. Armstrong. **2005**. Electrocatalytic hydrogen oxidation by an enzyme at high carbon monoxide or oxygen levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 16951-16954.
- Vincent, K. A., J. A. Cracknell, A. Parkin und F. A. Armstrong. **2005**. Hydrogen cycling by enzymes: electrocatalysis and implications for future energy technology. *Dalton T*: 3397-3403.
- Vincent, K. A., A. Parkin und F. A. Armstrong. **2007**. Investigating and exploiting the electrocatalytic properties of hydrogenases. *Chem Rev*, 107: 4366-4413.
- Vincent, K. A., A. Parkin, O. Lenz, S. P. Albracht, J. C. Fontecilla-Camps, R. Cammack, B. Friedrich und F. A. Armstrong. **2005**. Electrochemical definitions of O<sub>2</sub> sensitivity and oxidative inactivation in hydrogenases. *J Am Chem Soc*, 127: 18179-18189.
- Volbeda, A., P. Amara, C. Darnault, J. M. Mouesca, A. Parkin, M. M. Roessler, F. A. Armstrong und J. C. Fontecilla-Camps. **2012**. X-ray crystallographic and computational studies of the O<sub>2</sub>-tolerant [NiFe]-hydrogenase 1 from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 5305-5310.

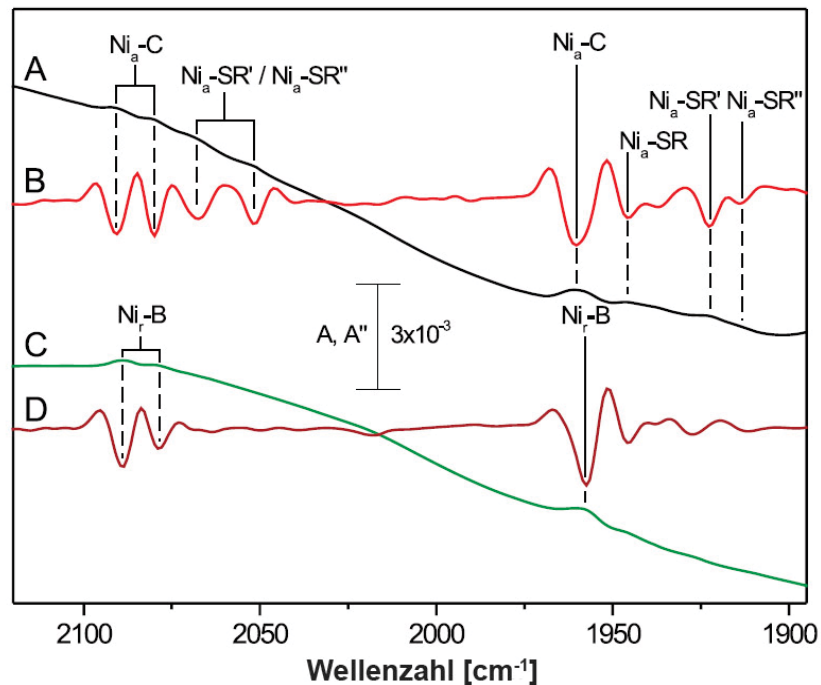
- Volbeda, A., M. H. Charon, C. Piras, E. C. Hatchikian, M. Frey und J. C. Fontecilla-Camps. **1995**. Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature*, 373: 580-587.
- Volbeda, A. und J. C. Fontecilla-Camps. **2005**. Structure-function relationships of nickel-iron sites in hydrogenase and a comparison with the active sites of other nickel-iron enzymes. *Coordin Chem Rev*, 249: 1609-1619.
- Volbeda, A., L. Martin, C. Cavazza, M. Matho, B. W. Faber, W. Roseboom, S. P. J. Albracht, E. Garcin, M. Rousset und J. C. Fontecilla-Camps. **2005**. Structural differences between the ready and unready oxidized states of [NiFe] hydrogenases. *J Biol Inorg Chem*, 10: 239-249.
- Volbeda, A., Y. Montet, X. Vernede, E. C. Hatchikian und J. C. Fontecilla-Camps. **2002**. High-resolution crystallographic analysis of *Desulfovibrio fructosovorans* NiFe hydrogenase. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27: 1449-1461.
- Voss, S. und A. Skerra. **1997**. Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein engineering*, 10: 975-982.
- Votyakova, T. V. und I. J. Reynolds. **2004**. Detection of hydrogen peroxide with Amplex Red: interference by NADH and reduced glutathione auto-oxidation. *Arch Biochem Biophys*, 431: 138-144.
- Watanabe, T. und K. Honda. **1982**. Measurement of the Extinction Coefficient of the Methyl Viologen Cation Radical and the Efficiency of Its Formation by Semiconductor Photocatalysis. *J Phys Chem*, 86: 2617-2619.
- Weckbecker, A., H. Groger und W. Hummel. **2010**. in Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.: Biosystems Engineering I, ed. C. Wittmann and R. Krull, Springer-Verlag, Berlin. S.95-242.
- Zeng, W., N. Silvernail, R. Scheidt und T. Sage **2007**. in "Application of physical methods to inorganic and bioinorganic chemistry" Editors Scott R.A. und C. Lukehart Wiley S.401-422
- Wilde, E., **1962**. Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von *Hydrogenomonas*. *Arch Microbiol*, 43: 109-137.
- Wilson, C. M., **1983**. Staining of proteins on gels: comparisons of dyes and procedures. *Methods in enzymology*, 91: 236-247.
- Wolf, I., T. Buhrke, J. Dornedde, A. Pohlmann und B. Friedrich. **1998**. Duplication of hyp genes involved in maturation of [NiFe] hydrogenases in *Alcaligenes eutrophus* H16. *Arch Microbiol*, 170: 451-459.
- Wu, S., J. P. Acevedo und M. T. Reetz. **2010**. Induced allostery in the directed evolution of an enantioselective Baeyer-Villiger monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 2775-2780.
- Yeh, J. I., A. Claiborne und W. G. Hol. **1996**. Structure of the native cysteine-sulfenic acid redox center of enterococcal NADH peroxidase refined at 2.8 Å resolution. *Biochemistry*, 35: 9951-9957.
- Zabinsky, S. I., J. J. Rehr, A. Ankudinov, R. C. Albers und M. J. Eller. **1995**. Multiple-scattering calculations of x-ray-absorption spectra. *Physical review. B, Condensed matter*, 52: 2995-3009.
- Zaborosch, C., M. Koster, E. Bill, K. Schneider, H. G. Schlegel und A. X. Trautwein. **1995**. EPR and Mößbauer spectroscopic studies on the tetrameric, NAD-linked Hydrogenase of *Nocardia-Opaca*-1b and its 2 dimers .1. The beta-delta-dimer - a prototype of a simple hydrogenase. *Biometals*, 8: 149-162.
- Zhao, T., F. Cruz und J. G. Ferry. **2001**. Iron-sulfur flavoprotein (Isf) from *Methanosarcina thermophila* is the prototype of a widely distributed family. *J Bacteriol*, 183: 6225-6233.

- Zirngibl, C., W. Van Dongen, B. Schworer, R. Von Bunau, M. Richter, A. Klein und R. K. Thauer. **1992**. H<sub>2</sub>-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase, a novel type of hydrogenase without iron-sulfur clusters in methanogenic archaea. *Eur J Biochem*, 208: 511-520.

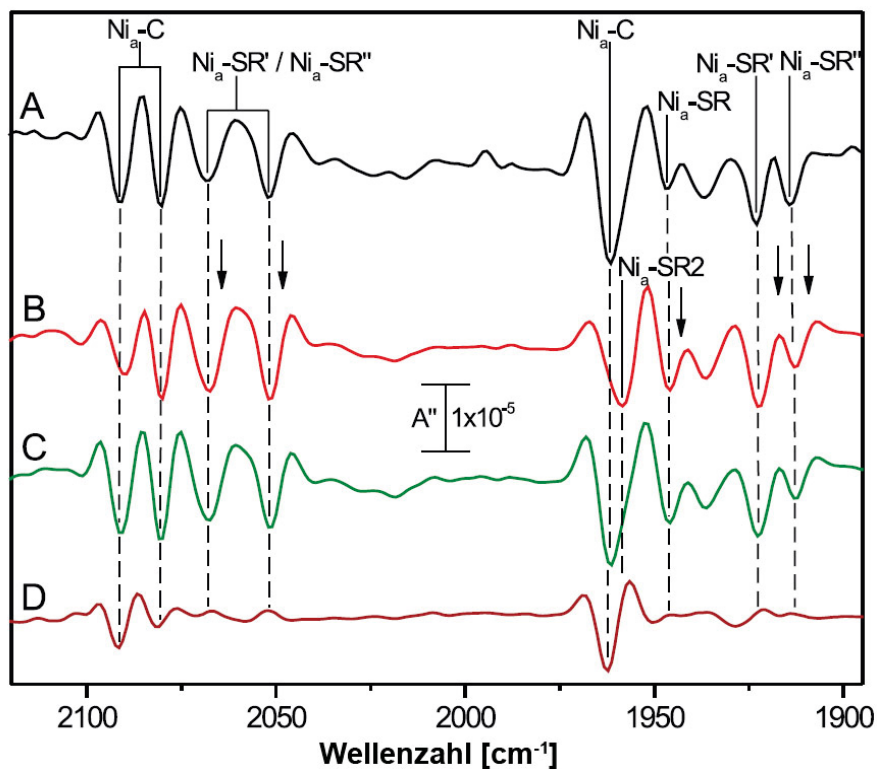
## 6. Anhang



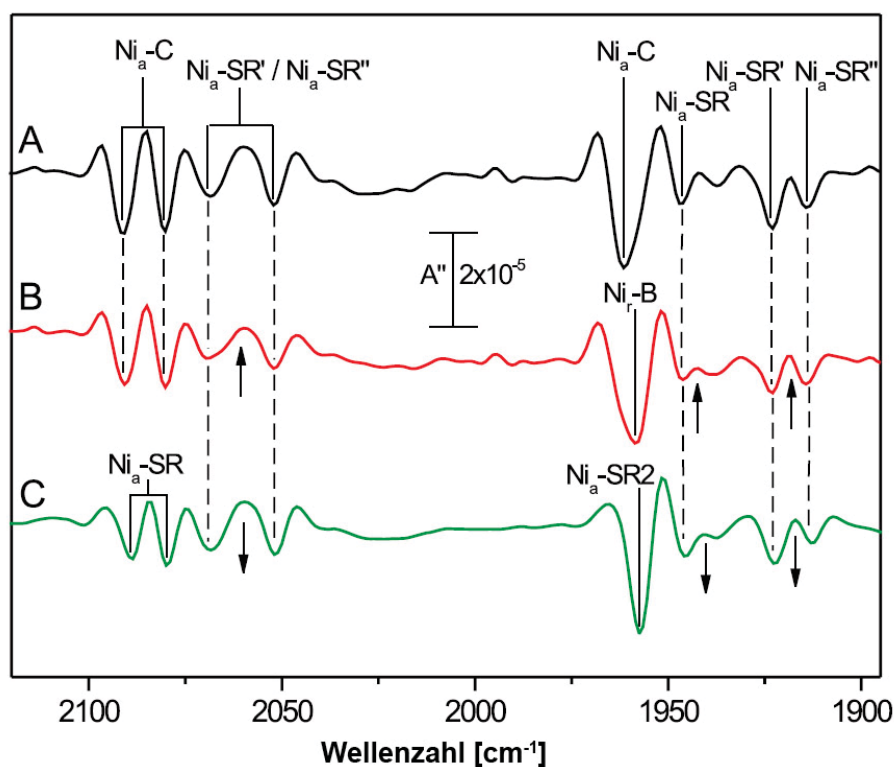
**Abb. S1: Untersuchung verschiedener *R. eutropha*-Stämme auf Hydrogenaseaktivität mittels Aktivitätsfärbung.** Spur 1: löslicher Extrakt (LE) von H16 (MBH<sup>+</sup>, RH<sup>+</sup>, SH<sup>+</sup>), Spur 2: LE von HF798 (MBH<sup>+</sup>, RH<sup>+</sup>, SH<sup>+</sup>), Spur 3: LE von HF500 (MBH<sup>+</sup>, RH<sup>+</sup>, SH<sup>-</sup>) A: RH- und MBH-spezifische Aktivitätsfärbung (Reaktion H<sub>2</sub> : PMS/NBT in 50 mM K-PO<sub>4</sub>, pH 5,5; 4% -15% natives PAGE-Gel, 150 µg löslicher Extrakt pro Spur, 2 h, 37 °C) B: SH spezifische Aktivitätsfärbung (Reaktion H<sub>2</sub>: NAD<sup>+</sup>/NBT in 50 mM TrisHCl, pH 8,0; 4 % -15% natives PAGE-Gel, 100 µg Protein pro Spur, 2 h, 37 °C); X: unbekannte Spezies, die auch ohne Wasserstoffbegasung auftritt.



**Abb. S2: Vergleich der absoluten Absorption mit der zweiten Ableitung von zwei beispielhaften Datensätze.** Aufgrund der niedrigen SH-Konzentrationen in ganzen *R. eutropha*-Zellen sind die Bandenintensitäten in der FTIR-Spektroskopie relativ gering. Aus Gründen der besseren Sichtbarkeit sind alle Spektren der *in situ*-Studie als zweite Ableitung gezeigt. Dabei erscheinen Absorptionsbanden als negative Peaks. Absolute Absorption (A und C) und 2. Ableitung (B und D) der „*in situ*“-FTIR-Spektren von frisch geernteten (A und B) und oxidierten Zellen (anaerob mit NAD<sup>+</sup>) (C und D).

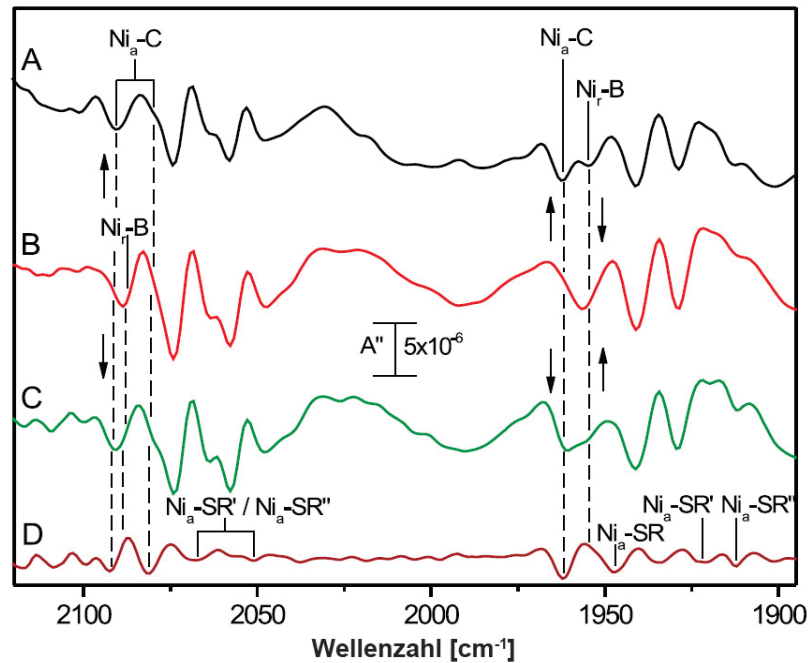


**Abb. S3: Reversibilität der Reduktion und Re-Oxidation der SH in ganzen Zellen.** A: frisch geernteten Zellen, B: nach 30 min Inkubation mit 1 bar H<sub>2</sub> und C: anschließende Inkubation (12 h) mit N<sub>2</sub>. D: Differenzspektrum (C minus B). Pfeile zeigen eine Intensitätsveränderung an.

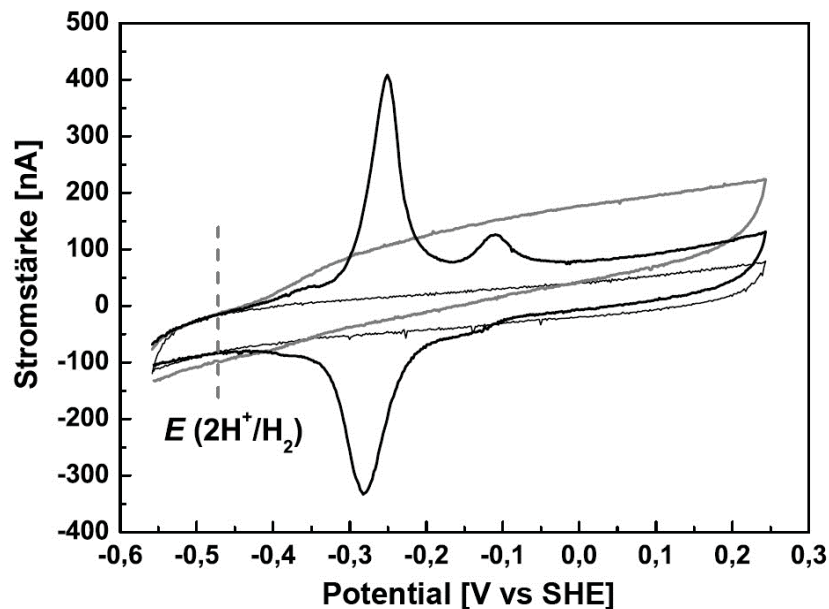


**Abb. S4: Reversibilität der Redoxreaktion zwischen oxidiertem und reduziertem [NiFe]-Zentrum.** Die *in situ*-FTIR Spektren von SH in ganzen Zellen (A) und nach drei aufeinanderfolgende Gefrier-Auftau-Zyklen unter aeroben Bedingungen (oxidiert, B) sind gezeigt. Die Ni<sub>a</sub>C-CO-Bande (1961 cm<sup>-1</sup>), sowie alle Absorptionen der reduzierten Zustände der frisch geernteten Zellen sanken auf Kosten der CO Streckschwingung des Ni<sub>r</sub>-B-ähnlichen Zustandes (1957 cm<sup>-1</sup>). Die erneute Reduktion durch 1 bar H<sub>2</sub> (30min) führte zu einer Intensitätssteigerung der reduzierten Zustände (C).



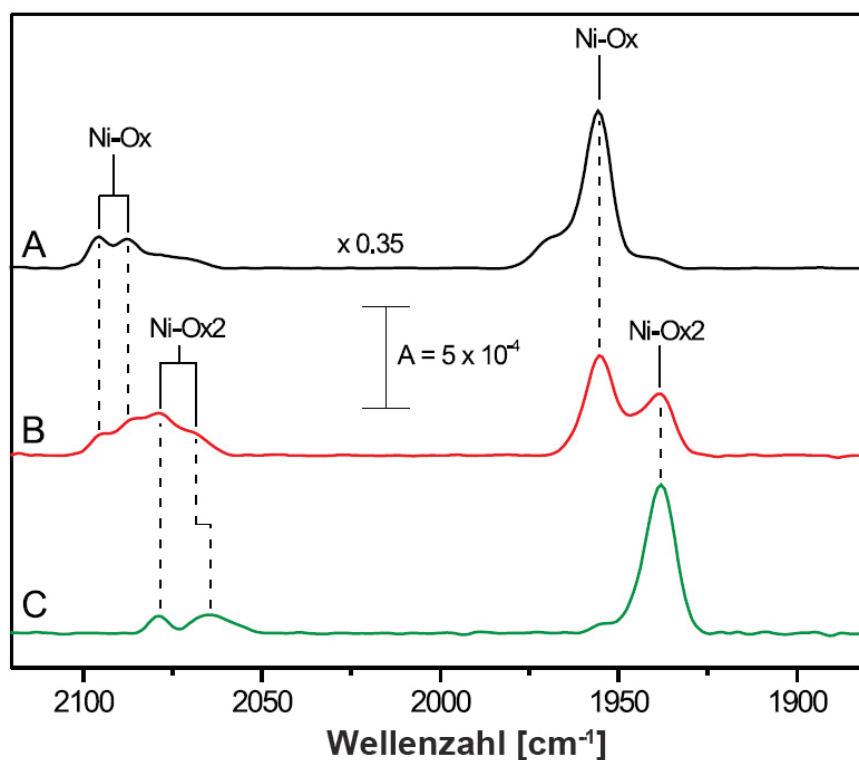


**Abb. S5: Reversibilität zwischen oxidiertem und reduziertem Zustand von lithoautotroph gewachsenen Zellen.** *In-situ*-FTIR Spektren von ganzen Zellen (A) nach Inkubation mit O<sub>2</sub> in luftgesättigten Puffer (B) und nach anschließender Gasaustausch durch Spülen mit N<sub>2</sub> (C). Das Differenzspektrum (C minus B) ist in D gezeigt. Im Gegensatz zu heterotrophen Wachstumsbedingungen, unter dem die SH synthetisiert wird, aber nicht zur Energieversorgung beiträgt, dient die SH während lithoautotrophen Wachstum mit H<sub>2</sub> als alleinige Energie-konservierende Hydrogenase. Der kontinuierliche Umsatz führt zu Proteinschäden, die durch nicht-gekennzeichnete starke IR-Absorptionsbanden deutlich werden. Diese Interpretation wird durch die Tatsache unterstützt, dass diese speziellen Absorptionsbanden nicht im Differenzspektrum erscheinen. Die Exposition der Zellen mit luftgesättigten Puffer (B) führt zu Ni<sub>r</sub>-B-ähnlichen Banden. Gleichzeitig verringerten sich die Ni<sub>a</sub>-C-assoziierten Absorptionen. Nach Spülung mit N<sub>2</sub> tauchen diese wieder auf (C). Zusätzlich sind Absorptionen der reduzierten Zustände zu identifizieren.

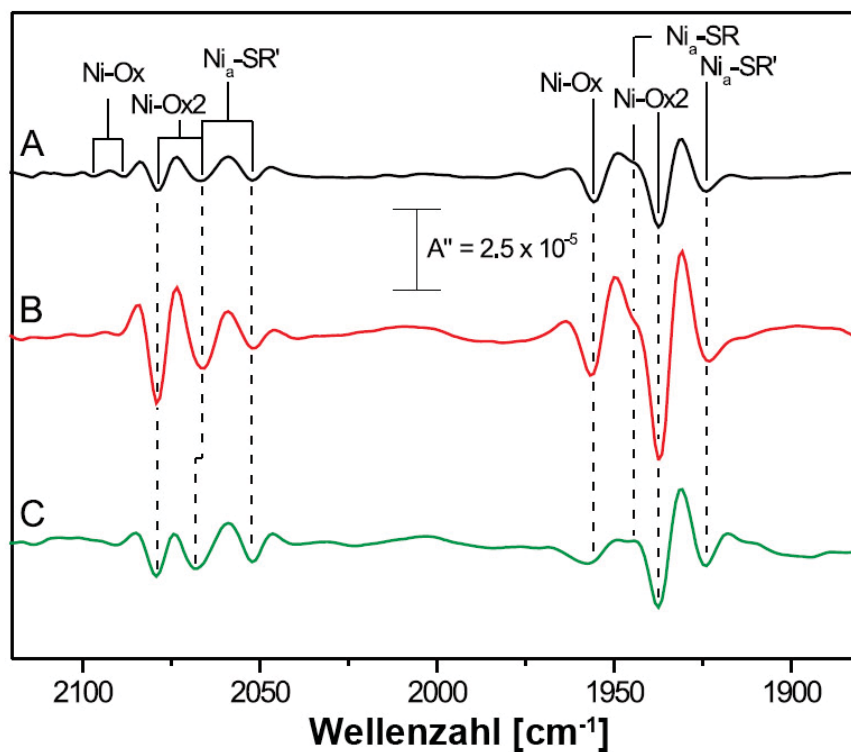


**Abb. S6: Elektrochemie mit HoxHY und externem FMN.** Zyklische Voltammogramme wurden für HoxHY auf einer PGE-Elektrode aufgezeichnet. (10 mV/s in TrisHCl Puffer (50 mM pH 8,0) bei 25 °C, 1 bar H<sub>2</sub>). Die Position von E (2H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>) ist als gestrichelte vertikale Linie gezeigt (korrigiert für die experimentellen Bedingungen). Der CV für einen Proteinfilm von HoxHY (12 μM), der mit FMN (~50 μM) vorbehandelt wurde, ist als dicke schwarze Linie gezeigt. Ein Kontrollexperiment für HoxHY unter analogen Bedingungen ist als graue Linie dargestellt. Ein Voltammogramm für eine unmodifizierte PGE ist als dünne schwarze Linie gezeigt.

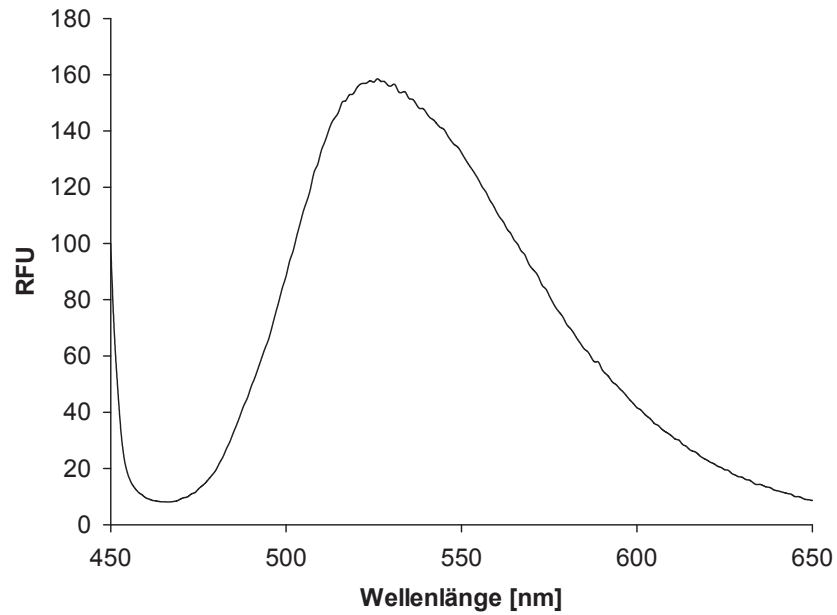




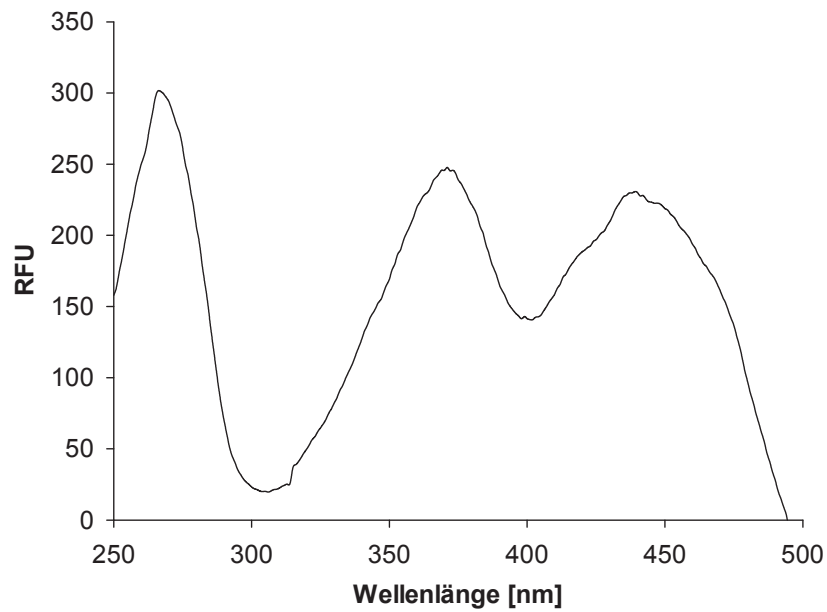
**Abb. S7: Variierenden Mengen der beiden oxidierten Redoxzustände in Präparationen von HoxHY.** In (A) ist eine Probe überwiegend in dem Ni-Ox-Zustand, in (B) ist eine Probe mit einer Mischung aus den Ni-Ox und Ni-Ox2-Zuständen und in (C) ist eine Probe bevorzugt in dem Ni-Ox2-Zustand gezeigt. Die Variation im Verhältnis der beiden Redoxzustände könnte mit leicht unterschiedlichen Expositionszeiten mit O<sub>2</sub> während der Reinigung zusammenhängen.



**Abb. S8: Behandlung von HoxHY mit artifiziellen Reduktionsmitteln führte zur partiellen Reduktion des [NiFe]-Zentrums.** A: Nach Reduktion mit Dithionit B: Nach Reduktion mit Dithionit und Methylviologen C: Nach Reduktion mit Dithionit und Methylviologen in Gegenwart von 1 bar H<sub>2</sub>.



**Abb. S9: Emissionsspektrum von HoxFU (4.5µM), angeregt bei 430nm.** Das Spektrum ist typisch für FMN. RFU: relative Fluoreszenz-Einheit (Units).



**Abb. S10: Anregungsspektrum von HoxFU (4.5µM), aufgenommen bei 525 nm.** Das Spektrum ist typisch für FMN. RFU: relative Fluoreszenz-Einheit (Units).

**Tabelle S1: Reinigungsverlauf der SH-Bindestellen-Derivate.** LE: löslicher Extrakt, El: Eluate nach Affinitätschromatographie

	Volumen [ml]	Protein [mg/ml]	Gesamt- protein [mg]	spez. Aktivität H <sub>2</sub> : NAD <sup>+</sup> [U/mg]	Gesamt- aktivität [U]	Anreicher- ungsfaktor	Ausbeute [%]
HoxF <sup>E341A</sup> LE	5	17,1	85,5	0,05	4,3	1,0	100,0
HoxF <sup>E341A</sup> El	1	0,4	0,4	0,86	0,34	17,3	7,9
HoxF <sup>D340A</sup> LE	5	18,8	94,0	0,4	37,6	1,0	100,0
HoxF <sup>D340A</sup> El	0,25	0,72	0,18	6,7	1,2	16,8	3,2
HoxF <sup>D401K</sup> LE	20	15,1	302,4	10,3	3116,4	1,0	100,0
HoxF <sup>D401K</sup> El	10	0,82	8,2	77,0	632,9	7,5	20,3
HoxF <sup>D467S</sup> LE	20	22,2	444,1	4,1	1827,9	1,0	100,0
HoxF <sup>D467S</sup> EL	7,5	1,17	8,8	54,6	480,3	13,3	26,3
HoxF <sup>D340A E341A</sup> LE	5	19,2	96,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HoxF <sup>D340A E341A</sup> El	0,20	0,30	0,06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HoxF <sup>D340A D401K</sup> LE	12	39,3	471,6	1,4	656,7	1	100
HoxF <sup>D340A D401K</sup> El	4	0,78	3,1	44,7	139,4	32,1	21,2
HoxF <sup>E341A D467S</sup> LE	12	27,2	326,4	1,7	552	1	100
HoxF <sup>E341A D467S</sup> El	6	0,58	3,48	25,6	89,1	15,1	16,1

## ***Danksagung***

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Bärbel Friedrich für die Überlassung des Themas sowie ihre Unterstützung und konstruktive Kritik.

Ganz herzlichen Dank an Dr. Oliver Lenz für seine Hilfe, seine wertvollen Kommentare und für alle konstruktiven Diskussionen im Verlauf meiner Arbeit.

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die Kooperationspartner im spektroskopischen und elektrochemischen Bereich: Vielen Dank an Dr. Kylie Vincent für die großartigen wissenschaftlichen Diskussionen an den erstaunlichsten Orten und vor allen Dingen am Institut für Anorganische Chemie an der University of Oxford. Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Juan Liu, Dr. Zul Idris, Holly Reeve und Dr. Philip Ash bedanken, ohne die ein Großteil der hier präsentierten Ergebnisse nicht erlangt worden wäre.

Dr. Ingo Zebger, Marius Horch, Dr. Miguel Saggu und Prof. Dr. Peter Hildebrandt vom Max-Volmer-Laboratorium für biophysikalische Chemie der TU Berlin sei für die hervorragende Kooperation im Bereich der IR- und EPR-Spektroskopie und für viele fruchtbare Diskussionen gedankt.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Kooperationspartnern bedanken, die zu den Ergebnissen dieser Arbeit beigetragen haben, namentlich bei Dr. Juliane Ratzka, Nicole Herr, Prof. Dr. Marion Ansorge-Schumacher, Dr. Friedhelm Lenz, Dr. Christian Teutloff, Prof. Dr. Robert Bittl, Dr. Michael Haumann, Prof. Dr. Wolfgang Kroutil, Prof. Dr. Wolfgang Lubitz, Dr. Hideaki Ogata, Dr. Sumire Honda, Dr. Bettina Nestl, Prof. Dr. Bernhard Hauer, und Prof. Dr. Silke Leimkühler.

Für Unterstützung bei der praktischen Laborarbeit danke ich vielmals Josta Hamann, Janna Schoknecht und Angelika Strack. Ich danke allen Arbeitskollegen für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre. Danken möchte ich im Besonderen Dr. Stefan Frielingsdorf, Dr. Johannes Fritsch, Dr. Ingmar Büstel, Katja Karstens, Olivia Neubauer, Franziska Kirsch, Dr. Stefanie Ganskow, Caspar Schäfer, Dr. Edward Schwartz, Prof. Dr. Thomas Eitingen für die ständigen wissenschaftlichen Diskussionen. Dabei nicht zu vergessen sind die tüchtigen Praktikanten Christina Lehning, Olivia Herczynski sowie Eric Manteufel, der als Bachelorstudent in unserem Labor tätig war. Mein besonderer Dank für eine ausgezeichnete Diplomarbeit und die Fähigkeit als Labor-DJ ist an Janina Preißler gerichtet. Außerdem ein großer Dank an Dr. Jean-Philippe Lonjaret und alle Doktoranden des BIG-NSE-Graduiertenkollegs für inspirierende Diskussionen. Die hier vorliegende Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die kontinuierliche Unterstützung in allen Lebenslagen durch meine Eltern sowie durch Sarah Stehr, Arne Wilmanns und Maria Seefeld.